

# Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen – von der molekularen Erkennung zur Wirkstofffindung

Mike Jaegle, Ee Lin Wong, Carolin Tauber, Eric Nawrotzky, Christoph Arkona und Jörg Rademann\*

**Stichwörter:**

Dynamisch-kovalente Chemie ·  
Fragment-basierte Wirkstofffindung ·  
Hochdurchsatz-Screening ·  
Molekulare Erkennung ·  
Proteintemplatreaktionen



**P**roteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen sind ein neuartiges Konzept zur Unterstützung der Wirkstofffindung und können dazu beitragen, die Wirksamkeit von Proteinliganden zu verbessern. Es handelt sich dabei um chemische Reaktionen zwischen niedermolekularen Verbindungen („Fragmenten“), die die Oberfläche eines Proteins als Reaktionsgefäß verwenden, um die Bildung eines Proteinliganden mit erhöhter Bindungsaffinität zu katalysieren. Die Methode nutzt die molekulare Erkennung kleiner reaktiver Fragmente durch die Proteine sowohl zur Assemblierung der Liganden als auch zur Identifizierung bioaktiver Fragmentkombinationen. Chemische Synthese und Bioassay werden dabei in einem Schritt vereint. Dieser Aufsatz diskutiert die biophysikalischen Grundlagen der reversiblen und irreversiblen Fragmentligationen und gibt einen Überblick über die Methoden, mit denen die durch das Proteintemplat gebildeten Ligationsprodukte detektiert werden können. Der chemische Reaktionsraum und aktuelle Anwendungen wie auch die Bedeutung dieses Konzeptes für die Wirkstofffindung werden erörtert.

## 1. Einleitung und Definition

Protein-bindende, bioaktive Moleküle sind die Ausgangspunkte für zukünftige Arzneistoffe und werden in den meisten Fällen in zwei klar voneinander getrennten Schritten identifiziert und optimiert: Zunächst werden niedermolekulare Verbindungen synthetisiert oder aus natürlichen Quellen isoliert, danach werden ihre biochemischen Eigenschaften in biologischen Testverfahren (Bioassays) untersucht (Abbildung 1A). Beide Schritte können im Zuge des Optimierungsprozesses iterativ durchlaufen werden. Dementsprechend ist die klassische Leitstruktursuche durch eine strikte Trennung zwischen der Synthese und Zusammenstellung von „chemischen Bibliotheken“ und deren Durchmusterung („Screening“) auf biologische Aktivität durch Protein-basierte oder zelluläre Assays charakterisiert.

Im Laufe der letzten 20 Jahre entwickelte sich jedoch ein alternatives Konzept der Wirkstoffentdeckung, das auf die Vereinigung der chemischen Synthese und der biologischen Testung in einem Schritt abzielte.<sup>[1–3]</sup> Dieser Ansatz nutzt die molekulare Erkennung von reaktiven, niedermolekularen Fragmenten durch Proteine sowohl zur Assemblierung der chemischen Liganden als auch zur Identifizierung von bioaktiven Fragmentkombinationen und wird daher als „Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligation“ bezeichnet (Abbildung 1B).

Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen bieten aus mehreren Gründen eine vielversprechende Alternative zur klassischen Wirkstofffindung: Durch die Zusammenführung von chemischer Synthese und Bioassay zu einem Schritt kann der anschließende Synthesaufwand auf die Herstellung der aktivsten Fragmentkombinationen beschränkt werden. Daher zeichnet sich die Methode durch eine hohe Effizienz aus und spart Zeit, Geld, Arbeitskraft und chemische Ressourcen. Bereits kleine Bibliotheken von wenigen Hundert bis Tausend reaktiven Fragmenten reichen aus, um den rele-

vanten chemischen Raum abzudecken sowie eine riesige Anzahl an möglichen Fragmentkombinationen und Fragmentligationsprodukten zu untersuchen. Zudem ermöglichen Fragmentligationen die Detektion von schwach affinen Fragmenten für eine räumlich aufgelöste Proteinbindungsstelle. Dies ist möglich, weil die Bindung des reaktiven Primärfragments oder der Proteinsonde die Bindung des Sekundärfragments an einem genau definierten Ort verstärkt.

In diesem Aufsatz werden wir den aktuellen Stand sowie das Potenzial von Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen in der Wirkstofffindung darstellen. Dazu schlagen wir zunächst eine umfassende Definition der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen vor:

Chemische Reaktionen zwischen zwei oder mehr niedermolekularen Verbindungen („Fragmenten“), welche die Proteinoberfläche als Katalysator nutzen, um die Bildung von Proteinliganden mit erhöhter Bindungsaffinität zu beschleunigen, werden als Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen bezeichnet.

Diese Definition umfasst sowohl reversible als auch irreversible Ligationsreaktionen. Wir halten es für sinnvoll, beide Reaktionstypen zusammen zu betrachten, da alle Templat-gesteuerten Ligationen denselben biophysikalischen Gesetzen unterliegen, dieselben Anforderungen an die Detektion der Ligationsprodukte stellen und eindrucksvolle Beiträge

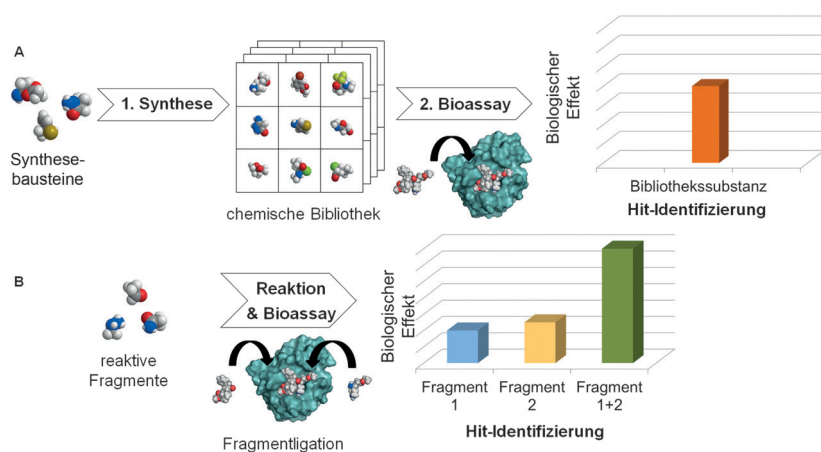
## Aus dem Inhalt

1. Einleitung und Definition	7465
2. Biophysikalische Grundlagen Proteintemplat-gesteuerter Fragmentligationen	7467
3. Detektion von Proteinbindenden Fragmenten und Fragmentligationsprodukten	7468
4. Die Chemie Proteintemplat-gesteuerter Fragmentligationen	7472
5. Praktische Beispiele und Anwendungen von Fragmentligationen	7475
6. Diskussion und Ausblick: Gegenwart und Zukunft der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligation	7482

[\*] M. Jaegle, E. L. Wong, C. Tauber, E. Nawrotzky, Dr. C. Arkona, Prof. Dr. J. Rademann  
Freie Universität Berlin, Medicinal Chemistry  
Königin-Luise-Straße 2 + 4, Berlin, 14195 (Deutschland)  
E-Mail: joerg.rademann@fu-berlin.de

Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter: <https://doi.org/10.1002/ange.201610372> zu finden.





**Abbildung 1.** A) Beim klassischen Ansatz der Wirkstofffindung werden große, im Voraus synthetisierte chemische Bibliotheken von wirkstoffartigen Molekülen mittels Bioassay getestet, um Hits zu generieren. B) Bei Templat-gesteuerten Fragmentligationen wird eine sehr viele kleinere Sammlung reaktiver Fragmente verwendet, die meist ein Molekulargewicht von < 250 Da haben. Die Assemblierung der Fragmente auf dem Proteintemplat ermöglicht die Verbindung von Synthese und Identifizierung der bioaktiven Fragmentkombinationen zu einem Schritt.

zur Wirkstofffindung geleistet haben. Darüber hinaus bietet diese Definition eine klare Abgrenzung Templat-gesteuerter Fragmentligationen von anderen katalytischen Transformationen durch Proteine, z. B. die Umsetzung von Enzymsubstraten. Bemerkenswerterweise sind Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen, die der obigen Definition folgen, ein nachgewiesener Wirkmechanismus mehrerer zugelassener

Arzneistoffe, was zeigt, dass derartige Reaktionen auch unter physiologischen Bedingungen effektiv ablaufen können. Der gegen Parkinson eingesetzte Wirkstoff Carbidopa bindet beispielsweise an das Enzym DOPA-Decarboxylase und reagiert mit dem Cofaktor Pyridoxalphosphat unter Bildung eines Hydrazons als aktiven Inhibitors (Abbildung 2A).<sup>[4]</sup> In ähnlicher Weise reagiert das Antikonvulsivum Vigabatrin über einen Proteintemplat-gesteuerten Mechanismus mit dem Cofaktor der GABA-Transaminase. Dabei wird ein Michael-Akzeptor gebildet, der das Enzym im Anschluss irreversibel hemmt (Abbildung 2B).<sup>[5]</sup> Weitere Beispiele für Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen bei zugelassenen Arzneistoffen finden sich bei Selegilin<sup>[6]</sup> (reagiert mit dem Cofaktor FAD im für die Depressionstherapie relevanten Zielprotein Monoaminoxidase) sowie Isoniazid (reagiert mit  $\text{NAD}^+$  in der Katalase aus *Mycobacterium tuberculosis*).

Da Fragmentligationen auf den thermodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Fragmenten und dem Protein beruhen, erläutern wir in Abschnitt 2 zunächst die biophysikalischen Grundlagen von Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen, um zu verdeutlichen, welches grundlegende Potenzial diese Methode bietet. Abschnitt 3 legt den Schwerpunkt auf die Detektion der Ligationsprodukte, die nach wie vor eine große Hürde in Frag-

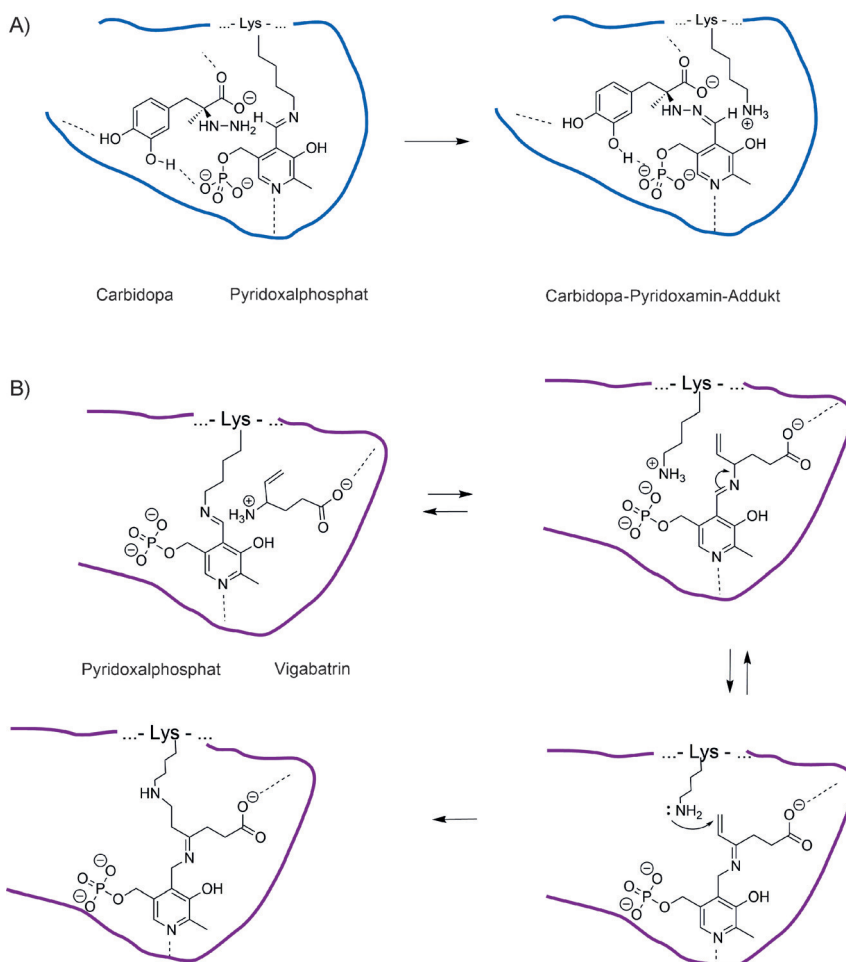


Jörg Rademann studierte Chemie und Biochemie an der Universität Konstanz (Deutschland) und der Rutgers University (New Jersey, USA). Anschließend promovierte er bei Richard R. Schmidt an der Universität Konstanz über die Festphasensynthese von Oligosacchariden. Nach einem Postdoktorat am Carlsberg Laboratory in Kopenhagen (Dänemark) bei Morten Meldal und Klaus Bock begann er seine unabhängige akademische Laufbahn an der Eberhard Karls Universität Tübingen mit Forschungen zur Verwendung von Polymerreagentien in der organischen und medizinischen Chemie. 2004 wurde er Professor für medizinische Chemie an der FU Berlin, wo sein Team am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) eine der ersten akademischen Screening-Einrichtungen Europas etablierte. Von 2010–2013 war er Inhaber des Lehrstuhls für medizinische Chemie an der Universität Leipzig und wechselte schließlich 2013 in gleicher Funktion an die FU Berlin.

Mike Jaegle, Ee Lin Wong, Carolin Tauber und Eric Nawrotzky sind Doktoranden mit unterschiedlichem akademischem Hintergrund in Chemie, Pharmazie und Molekularbiologie der Universitäten Freiburg (MJ), Johor Bahru, Taipei, und Seoul (ELW), Berlin (CT) sowie Leipzig (EN) und arbeiten alle an Projekten mit Proteintemplat-gesteuerten Reaktionen sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Christoph Arkona studierte Biochemie an der Leibniz Universität Hannover und wurde Mitglied der Gruppe nach seiner Promotion in Pflanzenbiochemie und einer vieljährigen Tätigkeit im Bereich Wirkstoffentwicklung in der Biotechnologiebranche.

Das Photo zeigt von links nach rechts: Mike Jaegle, Eric Nawrotzky, Jörg Rademann, Carolin Tauber, Christoph Arkona und Ee Lin Wong.



**Abbildung 2.** Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligation ist der Wirkmechanismus von einigen klinisch zugelassenen Wirkstoffen, z. B. Carbido (A) und Vigabatrin (B).

mentligationsassays darstellt (Abschnitt 3). In Abschnitt 4 geben wir einen Überblick über die bisherigen chemischen Reaktionen, die für eine Templat-gesteuerte Ligation verwendet wurden, und diskutieren mögliche zukünftige Erweiterungen des bestehenden Reaktionsrepertoires. Reversible Reaktionen, die im Rahmen der dynamisch-kombinatorischen Chemie untersucht wurden,<sup>[7–14]</sup> sowie irreversible Reaktionen, die auch als Ziel-geleitete Synthesen (target-guided synthesis, TGS) bezeichnet worden sind,<sup>[15]</sup> werden zusammen behandelt, da beide Reaktionsarten Beispiele für Templat-gesteuerte Ligationen liefern und die genaue Einordnung einer chemischen Reaktion in eine der beiden Kategorien oft schwierig ist. Repräsentative aktuelle Anwendungen von Templat-gesteuerten Ligationen in der Fragment-basierten Wirkstofffindung (FBWF) werden in Abschnitt 5 dargestellt, um zu zeigen, wie weit sich die Methode bis heute entwickelt hat. Abschließend werden wir in Abschnitt 6 den gegenwärtigen Stand von Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen diskutieren, wobei die Stärken und die für den Erfolg der Methode notwendigen Voraussetzungen erörtert werden. Dabei wird auch die Frage beantwortet, inwiefern Templat-gesteuerte Fragmentligationen eine Ergänzung zu den klassischen Methoden des Liganden-Screenings und der Fragment-basierten Wirkstofffindung sein können. Als Ab-

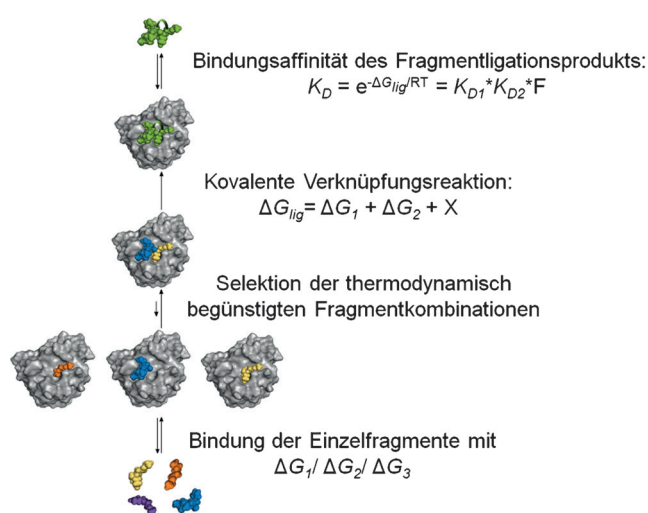
schluss folgt ein Ausblick auf Relevanz und mögliche Weiterentwicklungen der Methode für die Wirkstofffindung der Zukunft.

## 2. Biophysikalische Grundlagen Proteintemplat-gesteuerter Fragmentligationen

In einer Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligation fungiert das Protein als Katalysator für die Assemblierung eines Proteinliganden ausgehend von schwach bindenden, niedermolekularen Fragmenten. Dabei werden die chemisch reaktiven Molekülfragmente kovalent miteinander verknüpft und bilden dadurch eine Fragmentkombination mit erhöhter Bindungsaffinität und verbesserter biologischer Aktivität. Dieser Prozess setzt das Vorhandensein eines chemisch reaktiven, dynamischen Systems voraus, das dazu in der Lage ist, sich auf molekularer Ebene durch die Knüpfung und – im Fall der reversiblen Reaktionen – auch die Spaltung von kovalenten Bindungen anzupassen. Das System entwickelt sich so in einen thermodynamisch günstigeren Zustand und bringt dabei optimierte Proteinligand hervor. Solche adaptiven Systeme sind Beispiele für molekulares Lernen, wobei der Terminus „Lernen“ hier als Umschreibung eines adaptiven, chemisch veränderbaren und sich selbst optimierenden Systems verstanden werden kann.

Die Additivität der freien Bindungsenergien (Gibbs-Energien) stellt dabei die treibende Kraft der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen dar (Abbildung 3).<sup>[16,17]</sup> Zwei Fragmente binden unabhängig und ohne Überlappungen mit den freien Bindungsenergien  $\Delta G_1$  bzw.  $\Delta G_2$  an ein Protein.<sup>[18]</sup> Werden die beiden Fragmente nun durch eine reversible oder irreversible chemische Reaktion miteinander verknüpft, ergibt sich eine freie Bindungsenergie für das gebildete Ligationsprodukt von  $\Delta G_{\text{lig}} = \Delta G_1 + \Delta G_2 + X$ , wobei  $X$  für den Wert der Abweichung von der Addition der Bindungsenergien steht. Für den Fall, dass die kovalente Verknüpfung zweier Fragmente zur strikten Additivität der Bindungsenergien führt ( $X=0$ ), erhält man die resultierende Bindungsaffinität ( $K_D$ ) der Fragmentkombination als Produkt der Bindungsaffinitäten der Ausgangsfragmente:  $K_D = e^{-\Delta G/RT} = K_{D1}K_{D2}$ .<sup>[19,20]</sup> Haben zwei Fragmente z. B. einen  $K_D$ -Wert von 1 mM, ergibt sich als resultierende Bindungsaffinität des Ligationsprodukts ein  $K_D$ -Wert von 1  $\mu\text{M}$ . Bedingt durch zusätzliche, vom Linker beigetragene Bindungsenergie oder aufgrund des erfolgten Entropiegewinns können Fragmentkombinationen auch eine massive Superadditivität der Bindungsenergien aufweisen, was eine noch stärkere Erhöhung





**Abbildung 3.** Die durch Fragmentligation bedingte Additivität der Bindungsenergien resultiert in verstärkter Bindungsaffinität von Fragmentligationsprodukten.

der Bindungsaffinitäten zur Folge hat.<sup>[19]</sup> Gleichmaßen kann die Verknüpfung von zwei Fragmenten die freie Bindungsenergie des Ligationprodukts reduzieren, wenn der Linker die Bindung erschwert.

### 3. Detektion von Protein-bindenden Fragmenten und Fragmentligationsprodukten

Die Detektion von Protein-bindenden Fragmenten ist eine anspruchsvolle Aufgabe und bis heute eine der entscheidenden Einschränkungen bei der Entwicklung und Anwendung von Fragment-basierten Methoden in der Wirkstofffindung. Der Hauptgrund für dieses Detektionsproblem ist die schwache Affinität der Protein-bindenden Fragmente, sodass hohe Konzentrationen benötigt werden, um ein Detektionssignal zu erzeugen und möglicherweise zu sättigen. In einigen Assays, z. B. bei der Fluoreszenzanisotropie oder der Sättigungstransferdifferenz(STD)-NMR-Spektroskopie, kann stattdessen eine hohe Proteinkonzentration verwendet werden, um die Bindung eines niedermolekularen Liganden zu sättigen. Gegenüber anderen Fragment-basierten Methoden, bei denen keine Verknüpfung der Fragmente erfolgt, ist bei der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligation das Detektionsproblem durch die erhöhte Affinität des Ligationprodukts erheblich reduziert. Dadurch ist es grundsätzlich möglich, auch niedrigaffine Fragmente zu detektieren, die in anderen Fragment-basierten Assays z. B. infolge begrenzter Löslichkeit unentdeckt geblieben wären. Generell müssen Fragmente in Konzentrationen eingesetzt werden, die ihre Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) mindestens um das 10-Fache übersteigen, um ein starkes, gesättigtes Messsignal zu erzeugen. Im Unterschied dazu werden bei Fragmentligationsassays typischerweise Konzentrationen des Startfragments unterhalb des  $K_D$ -Werts eingesetzt, um so lediglich eine partielle Inhibition zu erreichen, die danach durch die Bildung

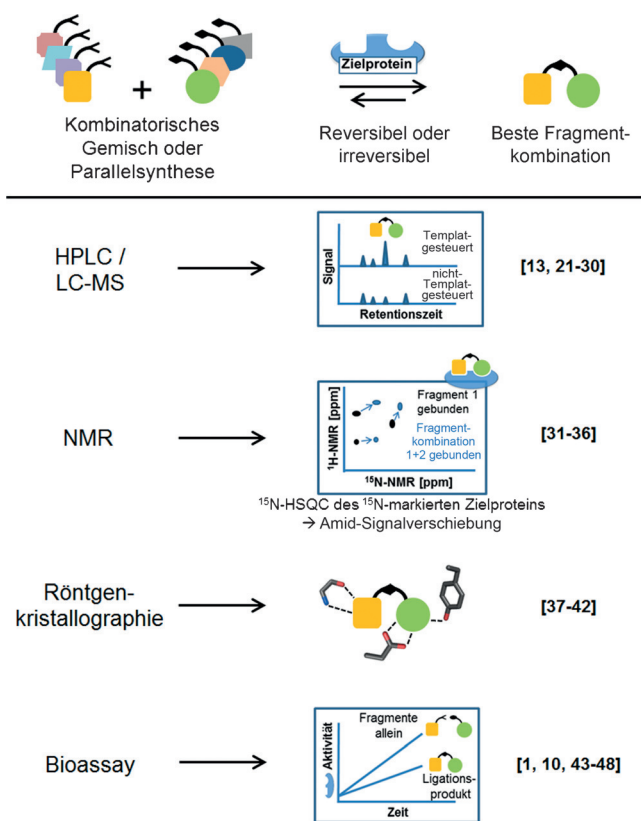
des stärker bindenden Ligationprodukts gesättigt werden kann.

Obwohl die Detektion von Fragmentligationsprodukten dadurch gegenüber der Bestimmung von Einzelfragmenten deutlich erleichtert wird, bleibt sie aus mehreren Gründen anspruchsvoll: Da das Ligationprodukt eine höhere Affinität zum Zielprotein aufweist als die Ausgangsfragmente, ist die Bildung des Produkts auto-inhibiert, und die Menge des gebildeten Produkts ist durch die eingesetzte Konzentration des Proteintemplats begrenzt. Daraus ergibt sich, dass die Fragmentligationsprodukte stets vor einem hohen Hintergrund durch überschüssige Einzelfragmente detektiert werden müssen.

Andere Herausforderungen können durch die Reaktivität der Fragmente im Assay entstehen. Während einige reaktive Fragmente tatsächlich bioorthogonal sind (z. B. die Startfragmente, die für dipolare Cycloadditionen eingesetzt werden), kommen bei vielen Fragmentligationen elektrophile Fragmente zum Einsatz, die auch mit den im Protein vorhandenen Nucleophilen reagieren könnten. Daher werden routinemäßig Kontrollexperimente durchgeführt, die eine Unterscheidung des Effekts eines Einzelfragments vom Effekt der Fragmentkombination ermöglichen und damit die Interferenz solcher Nebenreaktionen mit dem Assay-Ausgabesignal verhindern. Zusätzlich ist es ratsam, im Rahmen der Hit-Validierung einen unabhängigen zweiten Assay heranzuziehen, um somit mögliche falsch-positive Hit-Fragmente zu entlarven.

Einige der klassischen Analysemethoden wurden bereits breit für die Detektion von Templat-gesteuerten Fragmentligationen eingesetzt oder daran angepasst (Abbildung 4). In den meisten Arbeiten wurden chromatographische Methoden verwendet, gewöhnlich in Kombination mit Massenspektrometrie-gekoppelter Flüssigchromatographie (LC-MS).<sup>[13,21–30]</sup> In einigen Beispielen wurden speziell entwickelte NMR-Methoden genutzt.<sup>[31–36]</sup> Außerdem wurden Fragmentligationen röntgenkristallographisch untersucht.<sup>[37–42]</sup> Als wichtige Ergänzung wurde in den letzten Jahren die Detektion von Ligationprodukten durch verschiedene Bioassays entwickelt.<sup>[1,10,43–48]</sup>

Die Detektion von Fragmentligationsprodukten durch LC-MS wurde in den letzten 20 Jahren durch die rasante Entwicklung dieser Methode deutlich erleichtert, sowohl im Hinblick auf die chromatographische Trennung als auch hinsichtlich der Empfindlichkeit der Massendetektoren.<sup>[13,25–28]</sup> Dabei wurden nicht nur die Detektion, sondern auch die Quantifizierung und die Strukturaufklärung der Ligationprodukte durch den Einsatz von Extracted-Ion- oder Single-Ion-Chromatographie sowie MS-MS erheblich verbessert. Einige Einschränkungen bestehen jedoch weiterhin. Da die chromatographische Trennung Zeit benötigt, eignet sich die Detektion mit LC-MS am besten für irreversible oder quasi-irreversible Reaktionen.<sup>[15,49]</sup> Im Fall von reversibel gebildeten Ligationprodukten kann deren Fixierung durch eine chemische Reaktion oder die Verschiebung des pH-Werts eine Option sein. Diese Strategie wurde z. B. in der grundlegenden Arbeit von Huc und Lehn über „virtuelle chemische Bibliotheken“ verfolgt, in der instabile Imin-Ligationen durch chemische Reduktion zu stabilen



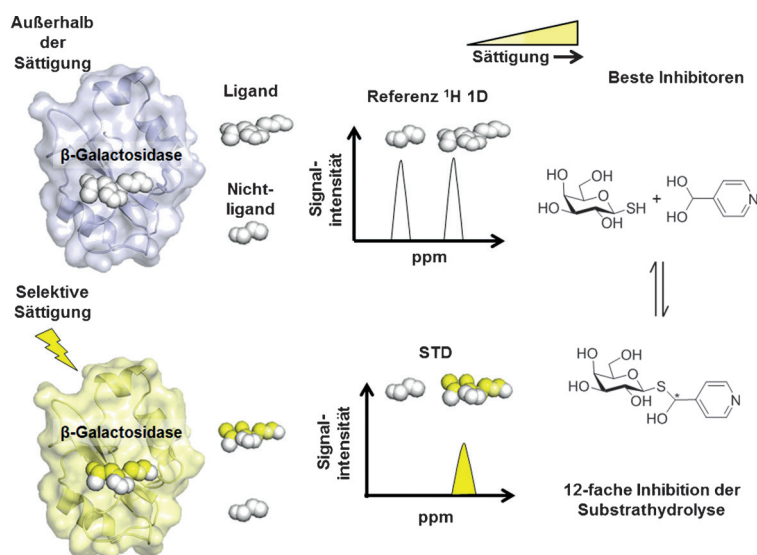
**Abbildung 4.** Überblick über die bisher verwendeten analytischen Methoden zur Detektion von Fragmentligationsprodukten.

Aminen umgesetzt wurden.<sup>[21]</sup> Eine zweite Einschränkung der LC-MS-Detektion kann sich durch das in der Fragmentligation verwendete Puffersystem ergeben. Viele der in den Ligationassays verwendeten Pufferionen stören die Detektion des Ligationprodukts im Massendetektor, wohingegen LC-MS-geeignete Puffersalze, beispielsweise Ammoniumformiat oder -acetat, durch Versetzen mit einem großen Überschuss an reaktiven Nucleophilen wiederum die Ligationreaktion beeinträchtigen können. In den letzten Jahren hat sich die native Massenspektrometrie zu einer ausgereiften Detektionsmethode im Bereich der Proteinbindenden Fragmente entwickelt. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Technik auch bei der Detektion von Fragmentligationsprodukten ihren Einzug halten wird.<sup>[50–53]</sup>

Gegenüber LC-Methoden hat die NMR-Spektroskopie den großen Vorteil, dass die erfolgte Ligation direkt in der Assaylösung nachgewiesen werden kann. Da für die klassische NMR-Spektroskopie jedoch eine hohe Konzentration des Ligationprodukts (mM) in einem Volumen von etwa 0.5 mL benötigt wird, damit eine chemische Analyse durchgeführt werden kann, sind auch dementsprechend hohe Proteinmengen vonnöten.<sup>[54]</sup> Daher ist die Methode nur anwendbar, wenn große Mengen an Protein zur Verfügung stehen und nur wenige Experimente mit geringem Durchsatz durchgeführt werden sollen. Durch Einsatz eines Gemisches reaktiver Fragmente kann der Durchsatz erhöht werden, wenn die Fragmentligation reversibel und kovalent verläuft.<sup>[33,55–57]</sup> Diese Gemische werden als dynamisch-kombinatorische Bibliothek (DKB) oder dynamisch-kova-

lente Bibliothek bezeichnet, und mit ihnen ist es prinzipiell möglich, alle potenziellen Kombinationen der eingesetzten Fragmentbausteine zu erzeugen. Wird z. B. eine Anzahl von  $n$  und  $m$  verschiedenen komplementären Fragmenten eingesetzt, können bis zu  $n \times m$  unterschiedliche Produkte erhalten werden. Das Proteintemplat verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des am stärksten gebundenen und daher auch am besten stabilisierten Ligationprodukts. Dieses kann anschließend durch eine der klassischen Detektionsmethoden nachgewiesen werden.

Mehrere NMR-Methoden wurden speziell an die Detektion von Fragmentligationsprodukten angepasst. So untersuchten Ramström et al. mittels  $^1\text{H}$ -STD-NMR-Spektroskopie die Proteintemplat-gesteuerte Bildung von Halbthioacetalen in wässrigem Milieu (Abbildung 5).<sup>[58]</sup>  $^1\text{H}$ -STD-NMR-Spektroskopie nutzt den selektiven Transfer von Proteinmagnetisierung auf einen reversibel gebundenen Liganden, was in diesem Beispiel dazu verwendet wurde, um bindende Fragmente einer DKB zu identifizieren. Für den generellen Machbarkeitsnachweis wurde das Zielprotein  $\beta$ -Galactosidase gewählt, das die Hydrolyse von O- $\beta$ -Galactosiden katalysiert und keinen Cystein-Aminosäurerest im aktiven Zentrum enthält. Ein Gemisch aus fünf Thiolen und zwei Aldehyden wurde verwendet, was zu einer möglichen Bildung von zehn unterschiedlichen Halbthioacetalen führte. 1- $\beta$ -Mercapto-D-galactose zeigte dabei eine stärkere Bindung an das Zielprotein als die vier anderen Thiole und vergrößerte die Signale beider Aldehyde im STD-Spektrum stark – vermutlich durch die Bildung von Halbthioacetalen. Überraschend war, dass die Bindung der beiden Zucker nicht durch Zugabe des Substrats verhindert werden konnte, was darauf schließen lässt, dass zusätzliche allosterische Bindungsstellen für die beiden Fragmente vorhanden sind. Eine der Thiol-Aldehyd-Kombinationen führte zu einer deutlichen Abnahme des Substratumsatzes und weist damit ebenfalls auf die Bildung von Halbthioacetalen als aktiven Inhibitoren hin. Ein weite-



**Abbildung 5.** Verwendung von  $^1\text{H}$ -STD-NMR-Spektroskopie zur Detektion von Proteintemplat-gebildeten Halbthioacetalen. Das Enzym führt zur Selektion des besten Inhibitors aus der dynamisch-kombinatorischen Bibliothek.<sup>[58]</sup>

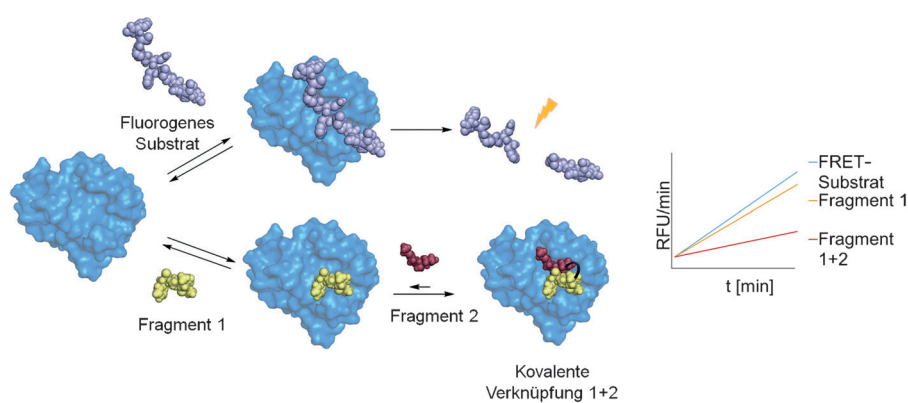
res Anwendungsbeispiel von STD-NMR-Spektroskopie wurde kürzlich von der Gruppe um Hirsch publiziert.<sup>[36]</sup> In einer aktuellen Veröffentlichung von Leung et al. konnten Fragmentligationsprodukte mittels  $^{11}\text{B}$ -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10, Abschnitt 5).<sup>[59]</sup>

Außer den Liganden-basierten NMR-Methoden wurden auch die Protein-basierten NMR-Methoden intensiv zur Detektion von Protein-bindenden Fragmenten eingesetzt.<sup>[60,61]</sup> Protein-NMR-Spektroskopie nutzt in vielen Fällen Proteine, die mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopen hergestellt worden sind, um damit eine Verstärkung des NMR-Signals

zu erreichen. Die Bindung von Fragmenten kann anschließend z.B. in 2D-HSQC-Experimenten bestimmt werden, indem die Änderungen der chemischen Verschiebung untersucht werden. Die Methode wurde als „Struktur-Wirkungs-Beziehung durch NMR-Spektroskopie“ vorgestellt und hat den großen Vorteil, dass auch Informationen zur Bindungsstelle des Fragments gewonnen werden können, wenn die Signale im NMR-Spektrum der Proteinstruktur zugeordnet werden.<sup>[62]</sup> Protein-basierte NMR-Spektroskopie kann auch eine hilfreiche Methode zur Untersuchung von Fragmentligationen sein, jedoch konnten von uns bisher keine Anwendungen dazu gefunden werden.

Röntgenkristallographie findet breite Anwendung im Bereich der Fragment-basierten Wirkstofffindung. Die Attraktivität der Methode beruht dabei auf den detaillierten Strukturinformationen, die vom Fragment-Protein-Komplex erhalten werden.<sup>[63]</sup> Diese Informationen können beim Design von Fragmentkombinationsprodukten enorm hilfreich sein. In einigen Arbeiten wurde bereits die Proteinkristallographie zur Detektion von Fragmentligationsprodukten verwendet.<sup>[37–42]</sup>

Die schnelle und parallele Detektion von potenten Fragmentligationsprodukten wurde schließlich durch die Einführung von Aktivitäts-basierten Bioassays erreicht. Die Strategie wurde zunächst als dynamisches Ligations-Screening (DLS) bezeichnet, da anfangs reversible Ligationsreaktionen untersucht wurden. DLS erhöhte die Empfindlichkeit, mit der Liganden detektiert werden können, erheblich, und so konnten durch orts aufgelöstes Screening niedrigaffine Fragmente mit  $K_D$ -Werten im millimolaren Bereich gefunden werden (Abbildung 6).<sup>[10,43]</sup> Aktivitäts-basierte Detektionsmethoden benötigen nur minimale Mengen an Protein; gewöhnlich reichen bereits Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich aus. Sie können mit der Standardausrüstung für biochemische Assays, beispielsweise Mikrotiterplatten und automatisierte Pipettierstationen zum Transfer der Fragmentbibliotheken, durchgeführt werden. Bei enzymatischen Assays ist die Empfindlichkeit durch die katalytische Aktivität des Zielproteins noch zusätzlich erhöht, da ein schneller Umsatz von vielen fluorogenen/chromogenen Sub-



**Abbildung 6.** Konzept des dynamischen Ligations-Screenings (DLS). Ein fluorogenes Substrat konkurriert mit dem reaktiven, inhibitorischen Fragment 1 um das aktive Zentrum der Protease. Zugabe des reaktiven Fragments 2 führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der kovalenten Verknüpfung der beiden Fragmente auf der Oberfläche des Proteins, was wiederum mit einer Erhöhung der Inhibition einhergeht.

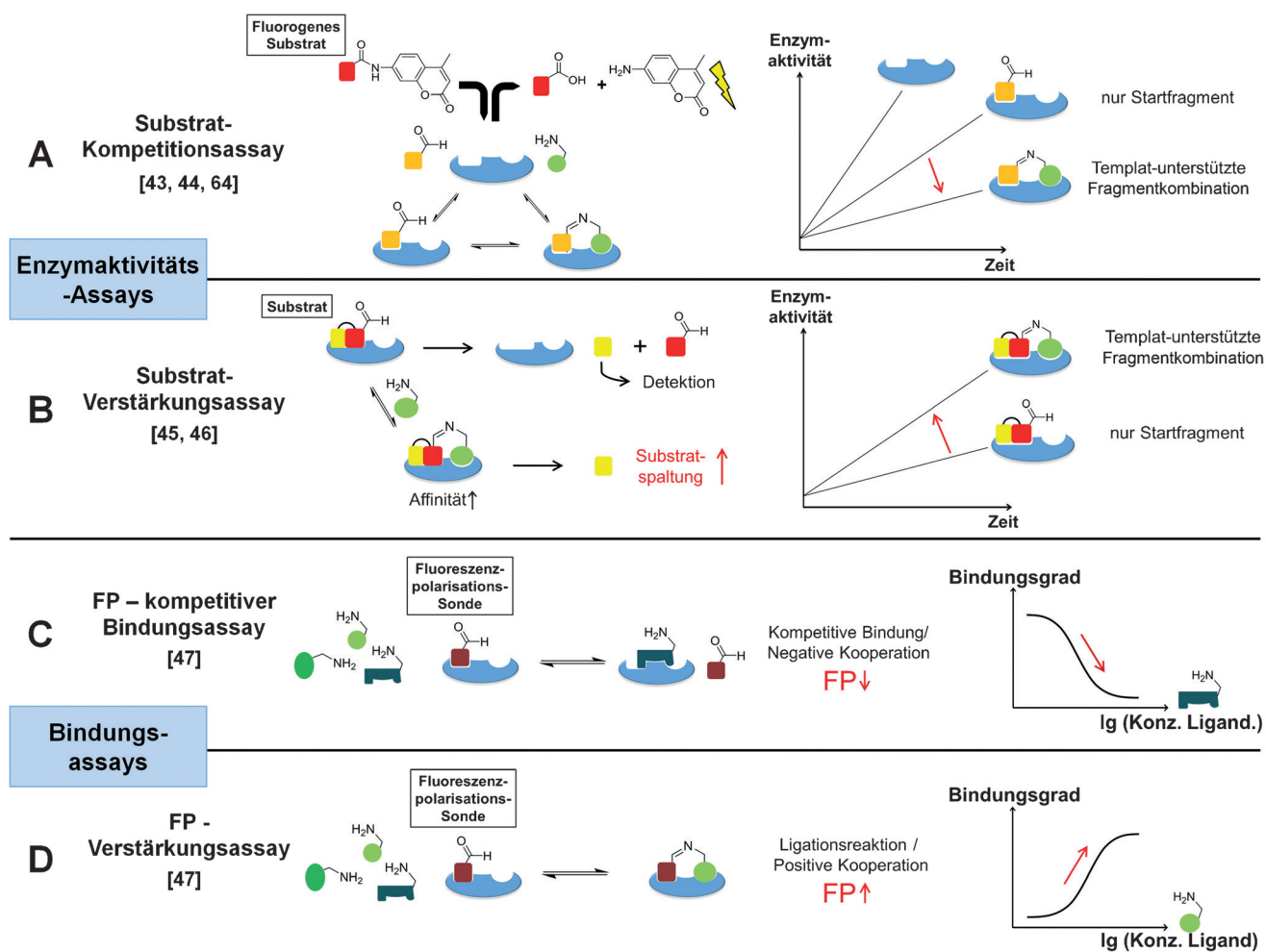
stratmolekülen erfolgt. Resonanter Fluoreszenzenergie-transfer (FRET) konnte ebenfalls zur Detektion von Fragmentkombinationen eingesetzt werden.<sup>[44]</sup> Um die höchste Empfindlichkeit zu erreichen, muss das reaktive, primäre Fragment in einer Assaykonzentration eingesetzt werden, die zu 10–20-prozentiger Inhibition führt und dadurch ein Messfenster von 80–90% zur Detektion der verstärkten Inhibition nach Versetzen mit dem sekundären Fragment offen lässt.

Mittlerweile sind verschiedene Formate von Bioassays an das dynamische Ligations-Screening angepasst worden (Abbildung 7). Wie bereits beschrieben, kann ein fluorogenes Substrat in einem Kompetitionsassay verwendet werden, wo es mit dem Fragmentligationsprodukt um die Bindungsstelle am Protein konkurriert. In diesem Assay führt die beste Fragmentkombination zur stärksten Inhibition der enzymatischen Reaktion (Abbildung 7A).

Alternativ kann auch das Substrat selbst eine reaktive, funktionelle Gruppe tragen, die sich zur Fragmentligation eignet. Das angeknüpfte Fragment kann dabei zu einer Erhöhung der Substrataffinität zum Zielprotein führen. Derartige Substrat-Verstärkungsassays (Abbildung 7B) ermöglichen die orts aufgelöste Identifizierung von Fragmenten, die an sekundäre Bindungsstellen binden und dadurch zu einem beschleunigten Substratumsatz führen.<sup>[45]</sup> Mit diesem Assayformat können auch kompetitiv bindende Liganden erfasst werden. Im speziellen Fall, dass das reaktive, fluorogene Molekül ohne angeknüpftes Fragment komplett inaktiv ist, wurde es als ein Präsubstrat bezeichnet, das sich besonders für die empfindliche Detektion von kurzlebigen, chemisch instabilen Ligationsprodukten, z.B. von Halbacetalen und Halbthioacetalen, eignet.<sup>[46]</sup> Die Methode wurde eingesetzt, um Fragmente zu identifizieren, die an sekundäre Bindungsstellen von Serinproteasen<sup>[46]</sup> und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs)<sup>[45]</sup> binden. Im Fall der Protein-Tyrosin-Phosphatasen konnten so spezifische, sekundäre Bindungstaschen besetzende Fragmente gefunden werden, die als Startpunkt für PTP-spezifische Inhibitoren genutzt wurden.

Das Prinzip der Bioaktivitäts-basierten Detektion von Fragmentligationsprodukten konnte von enzymatischen





**Abbildung 7.** Überblick und repräsentative Beispiele zur Detektion von Templat-gebildeten Fragmentkombinationen mittels Bioaktivitäts-basierter Detektionsmethoden.

Assays auch auf Proteinbindungsassays ausgeweitet werden, wodurch die Identifizierung von Liganden nichtenzymatischer Bindungsstellen möglich wurde. Proteinbindungsassays können prinzipiell in homogener Lösung oder in einem heterogenen System durchgeführt werden, wenn einer der Bindungspartner zuvor auf einer Festphase oder Oberfläche immobilisiert wurde. Ein homogener Bindungsassay für Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen konnte z.B. durch Detektion mittels Fluoreszenz-polarisation (FP), auch bekannt als Fluoreszenz-anisotropie, entwickelt werden (Abbildung 7C,D).<sup>[47]</sup> Für diesen Assay wurde ein reaktives, Protein-bindendes Peptidfragment mit einem Fluorophor markiert. Der FP-Ligand (10 nM) wurde dazu in einer Pufferlösung gelöst, die das Zielprotein in einer Konzentration enthielt, die zu 50-prozentiger Bindung des Liganden führte. Anschließend wurde eine Fragmentbibliothek auf Substanzen durchgemustert, die zu einer Veränderung des FP-Signals führen. Der Assay ermöglichte die Identifizierung von sowohl kompetitiven (Abbildung 7C) als auch verstärkenden Fragmenten (Abbildung 7D) innerhalb eines Experiments. Gleichzeitig konnte bei diesem Versuch der Proteintemplat-effekt für die Fragmentkombination mit dem höchsten Verstärkungseffekt quantifiziert werden. Reduktive Aminierung

des markierten Fragments mit dem am besten verstärkenden Fragment lieferte einen pikomolaren Inhibitor. Wie Enzym-inhibitionsassays können auch die homogenen Proteinbindungsassays (z.B. FP-Assays) im Hochdurchsatzformat, in niedrigen Volumina und bei geringen (nM) Proteinkonzentrationen durchgeführt werden, vorausgesetzt ein Ligand mit ausreichender Affinität ist als Startpunkt vorhanden.

Markierungsfreie, homogene Proteinbindungsassays wären eine vielversprechende Ergänzung zur Detektion von bioaktiven Fragmentligationsprodukten. Beispielsweise werden zunehmend Thermal-Shift-Assays zur Detektion von Protein-Ligand-Komplexen eingesetzt.<sup>[65,66]</sup> Bei dieser Methode wird die Entfaltung eines Proteins (auch als „Schmelzen“ bezeichnet) bei steigender Temperatur untersucht, indem Fluorophore eingesetzt werden, die bei Kontakt mit dem hydrophoben Kern eines sich entfaltenden Proteins zu erhöhter Fluoreszenz führen. Eine Bindung des Fragments des Proteins festgelegt werden, bedingt durch die freie Bindungsenergie des Liganden. Noch mehr thermodynamische Daten zur Bindung von Fragmenten können durch die isothermale Titrationskalorimetrie erhalten werden, eine Technik, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine

Rolle in zukünftigen Projekten spielen wird – obwohl sie hohe Proteinmengen benötigt und sich nur für Anwendungen mit geringem Durchsatz eignet.<sup>[67–70]</sup> Auch heterogene Proteinbindungsassays wurden zur Untersuchung von Proteinbindenden Fragmenten eingesetzt. Bei diesen Methoden werden unmarkierte Fragmente eingesetzt, jedoch ist eine kovalente Immobilisierung oder die Bindung an eine Affinitätssonde, wie Biotin, erforderlich.<sup>[71–74]</sup>

Kürzlich konnte die Bioaktivitäts-basierte Detektion von Fragment-Ligationsprodukten sogar auf die gegenüber Proteinassays noch deutlich komplexeren Zellexperimente ausgeweitet werden.<sup>[75,76]</sup> Maki et al. berichteten von der intrazellulären Bildung von Inhibitor **3** des Proteins 14-3-3 durch eine intrazelluläre Oximligation (Abbildung 8). 14-3-3 wechselwirkt über Protein-Protein-Interaktionen (PPIs), die besonders schwer zu inhibieren sind, da die Wechselwirkungen von großen und dynamischen Interaktionsflächen von Molekülen unterbrochen werden müssen, die über zelluläre Aufnahme an den Wirkort gelangen müssen. Die Autoren konnten dabei feststellen, dass reaktive Aldehydderivate von Fusicoccin A (Fc, **1**) an eine hydrophobe Tasche binden, die benachbart zur Bindungsstelle des Peptids **2** ist, das seinerseits eine Hydroxylaminygruppe trägt. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass in Gegenwart von Protein 14-3-3 eine Templat-gesteuerte Bildung des hetero-bivalenten Ligationsprodukts **3** erfolgte, das sich als potenter Oximinhibitor herausstellte. Als Nächstes wurde die intrazelluläre Bildung von **3** in stabil transformierten HEK293-Zellen (Flag-14-3-3- $\zeta$ -Zelllinie) untersucht. Durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) konnte nachgewiesen werden, dass **3** in Zellen, die mit **1** und **2** behandelt wurden, gebildet wurde und zum stärksten zytotoxischen Effekt führte. Die chemisch synthetisierte Referenzverbindung **3** zeigte hingegen keine Aktivität, vermutlich wegen des erhöhten Molekulargewichts, das die Aufnahme in die Zellen erschwert (Abbildung 8).<sup>[77]</sup> Somit zeigt diese Studie, dass auch größere Moleküle, die potenziell dazu in der Lage sind, PPIs zu modulieren, durch intrazelluläre Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligation gebildet werden können.

Insgesamt haben die erheblichen Fortschritte bei den Detektionsmethoden in den letzten Jahren – besonders bei den Bioaktivitäts-basierten Methoden, aber auch bei den klassisch analytischen sowie den biophysikalischen Detektionsmethoden – die Identifizierung bioaktiver Fragmentligationsprodukte in Proteinbindungsassays wie auch in den enzymatischen und zellulären Assays erheblich erleichtert. Diese Entwicklung wird zukünftig die Entdeckung weiterer Beispiele von Templat-gesteuerten Fragmentligationen ermöglichen und damit zu einer erfolgreichen Anwendung der Fragmentligationsassays beitragen.

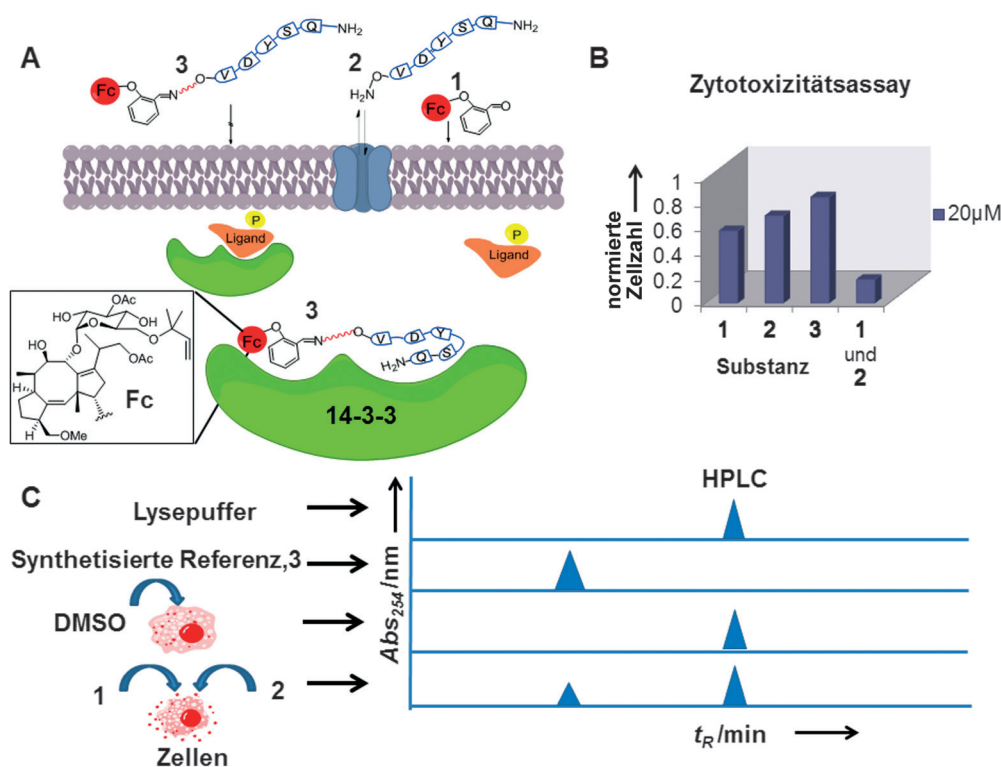
Insgesamt haben die erheblichen Fortschritte bei den Detektionsmethoden in den letzten Jahren – besonders bei den Bioaktivitäts-basierten Methoden, aber auch bei den klassisch analytischen sowie den biophysikalischen Detektionsmethoden – die Identifizierung bioaktiver Fragmentligationsprodukte in Proteinbindungsassays wie auch in den enzymatischen und zellulären Assays erheblich erleichtert. Diese Entwicklung wird zukünftig die Entdeckung weiterer Beispiele von Templat-gesteuerten Fragmentligationen ermöglichen und damit zu einer erfolgreichen Anwendung der Fragmentligationsassays beitragen.

#### 4. Die Chemie Proteintemplat-gesteuerter Fragmentligationen

Zahlreiche Reaktionstypen wurden bereits für Templat-gesteuerte Fragmentligationen verwendet. Hier werden wir einen Überblick über diese Reaktionen geben, uns dabei auf Neuzugänge zu diesem Repertoire konzentrieren und einen Ausblick auf zu erwartende zukünftige Erweiterungen geben. Aus der Perspektive der praktischen Anwendung ist der Grad der Reversibilität der Ligationsreaktion ein wichtiges Kriterium, da sie die Detektion und die Isolierung der Ligationsprodukte beeinflusst. Daher wurden die in Templat-gesteuerten Fragmentligationen genutzten Reaktionen hier entsprechend ihrer Reversibilität geordnet (Tabelle 1).

Additionen von Heteronukleophilen an aliphatische oder aromatische Aldehyde/Ketone sind typische reversible Ligationsreaktionen, die in wässriger Lösung wegen der niedrigen Aktivierungsbarriere mit schneller Gleichgewichtseinstellung verlaufen. In Abhängigkeit vom eingesetzten Nukleophil zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Reversibilität und Kinetik der Reaktionen.

Halbacetale und Halbthioacetale werden durch Templat-gesteuerte Fragmentligation von Aldehyden mit Alkoholen bzw. Thiolen



**Abbildung 8.** A) Intrazelluläre Bildung des Protein-14-3-3-Inhibitors **3** durch Proteintemplat-gesteuerte Oximligation. B) Zytotoxizitätsassay von HEK293-Zellen: Flag-14-3-3- $\zeta$ -Zellen wurden mit Konzentrationen von jeweils 20  $\mu\text{M}$  der Verbindung **1**, **2**, **3** sowie **1** und **2** kombiniert behandelt. C) HPLC-Analytik der intrazellulären Bildung des Oximligationsprodukts **3**.<sup>[77]</sup>

Tabelle 1: Fragmentligationen mit Anwendung in der FBWF.

Elektrophil	Nukleophil	Refs.
	$R_2\text{-[OH, SH]}$	a) [46, 78] b) [46, 73, 79]
	$2 R_2\text{-[OH, SH]}$	c) [80, 81] d) [82] e) [36, 46]
	$R_2\text{-NH}_2$	f) [10, 43-47, 83-85] f) [86]
	$R_2\text{-NH-NH}_2$ or $R_2\text{-NH-C(=O)-NH}_2$	g) [14, 86-97] g') [98, 99]
	$R_2\text{-O-NH}_2$	h) [76, 100]
	$R_2\text{-CH(OH)-R}_3$	i) [59, 130]
	$R_3\text{-S}^\ominus$	j) [101-107]
	$R_3\text{-S}^\ominus$	k) [5, 82, 108-111]
	$R_3\text{-C#C-R}_4$	l) [112]
	$R_3\text{-CH=CH-R}_4$	m) [113-115]
	$R_2\text{-CH(R}_3\text{)-NO}_2$	n) [56, 111, 116]
	$R_1\text{-SH}$	o) [46, 117]
	$R_1\text{-SH}$	p) [24]
	$R_1\text{-S(=O)-N}_3$	q) [118-120]
	$R_2\text{-C#C-H}$	r) [25, 76, 121-125]
	$R_1\text{-[SH, NH}_2\text{]}$	s) [75]
	$R_1\text{-NH}_2$	t) [48]

a) Halbacetalbildung, b) Halbthioacetalbildung, c) Acetalbildung, d) Thioacetalbildung, e) N,S-Acetalbildung, f) Iminbildung, g) Hydrazonbildung, g') Acylhydrazonbildung, h) Oximbildung, i) Boronatbildung, j) Disulfidbildung, k) Thioesterbildung, l) Alkenmetathese, m) Alkinmetathese, n) Nitroaldolbildung, o) Alkylierung, p) Amidierung zwischen Sulfonylaziden und Thiosäuren, q) 1,3-dipolare Cycloaddition, r) Addition, s) Ringöffnung, t) Amidierung zwischen Aminen und Aktivestern.

schnell in wässriger Lösung gebildet, obwohl sie nicht als stabile Ligationsprodukte isoliert werden können.<sup>[46,58,78,79]</sup> Die Bildung von Halbacetalen und Halbthioacetalen als Ligationsprodukte ist durch den mit dem Heteronukleophil

konkurrierenden, hohen molaren Überschuss an Wasser (55M) erschwert, das Hydrate als alternative Reaktionsprodukte liefert. Ungeachtet dessen konnte mittels NMR-Spektroskopie<sup>[58]</sup> und Bioaktivitäts-basierter Assays nachgewiesen



werden, dass das Proteintemplat dazu in der Lage ist, das Ligationsgleichgewicht zu verschieben und damit die Identifizierung von Halbacetalen und Halbthioacetalen als Ligationsprodukte zu ermöglichen.<sup>[46]</sup> Anders als für die Halbacetale/Halbthioacetale konnte bisher keine Bildung von Vollacetalen/Dithioacetalen durch die Addition von zwei Alkohol- bzw. Thiolnucleophilen an eine Carbonylgruppe in Form einer Templat-gesteuerten Reaktion nachgewiesen werden, was aber wegen der hohen Aktivierungsenergie des carbokationischen Intermediats auch nicht erwartet werden kann.<sup>[80–82]</sup>

Viele der Templat-gesteuerten Ligationen umfassen die Reaktion eines Stickstoff-Nucleophils mit einem Carbonyl-Elektrophil. Die Addition von primären Aminen an Aldehyde führt dabei zu Halbaminale als Intermediate, die danach zu Iminen weiterreagieren.<sup>[126,127]</sup> Die Bildung von Iminen ist ebenfalls ein Prozess mit schneller Gleichgewichtseinstellung, erfordert aber ein unprotoniertes Amin, um ausreichende Reaktivität zu gewährleisten.<sup>[10,43,44,46,47,83,84]</sup> Daher ist die Reaktion vom  $pK_S$ -Wert des Amin-Nucleophils und dem pH-Wert des Reaktionspuffers abhängig. Imine sind, besonders wenn aromatische Amine eingesetzt werden, erheblich stabiler als Halbacetale und können in bestimmten Fällen sogar isoliert werden.

Als Konsequenz aus der erhöhten Stabilität von Iminen kann die Gleichgewichtseinstellung einer entsprechenden DKB jedoch erheblich langsamer erfolgen als bei Halbacetalen und Halbthioacetalen. Die Stabilität von Amin-Aldehyd-Ligationsprodukten kann weiterhin erhöht werden, wenn ein Aldehyd eingesetzt wird, der CH-acide Wasserstoffatome in  $\alpha$ -Position trägt, wodurch die Bildung des entsprechenden Enamins möglich ist. Eine andere Option besteht in der chemischen Fixierung des Imins durch eine irreversible Folgereaktion, beispielsweise durch reduktive Aminierung, mit sekundären Aminen als Reaktionsprodukt.<sup>[86,99]</sup> Die Stabilität der Ligationsprodukte von Aldehyden mit Stickstoff-Nucleophilen ist noch höher, wenn Hydroxylamine, Hydrazine oder Acylhydrazide eingesetzt werden.<sup>[14,77,86–97,100,125]</sup> Die als Produkt gebildeten Oxime bzw. (Acyl-)Hydrazone sind unter physiologischen pH-Bedingungen stabil und können mithilfe gängiger Verfahren (z.B. Säulenchromatographie) aufgereinigt werden. Dementsprechend ist jedoch die Gleichgewichtseinstellung der Ligationsreaktion sehr langsam, oder es wird Anilin als Katalysator zugesetzt, um die Oxim- oder Hydranbildung zu beschleunigen.<sup>[86,87,89,99]</sup> Alternativ kann die Gleichgewichtseinstellung von Acylhydrazonen auch durch Säurezugabe vorangetrieben werden.<sup>[98]</sup>

Andere Ligationen von Heteronucleophilen mit Aldehyden sind denkbar, müssen aber noch weitergehend untersucht werden. Beispielsweise reagieren Thiole mit Iminen zu N,S-Acetalen, wobei das dabei entstehende Ligationsgleichgewicht durch Versetzen mit einem Proteintemplat verschoben werden kann.<sup>[43,46,112]</sup> Die Bioaktivitätsdaten lassen darauf schließen, dass die trimeren Komplexe aus Aldehyd, Amin und Thiol eine stärkere Affinität zum Zielprotein haben, was sich durch einen reduzierten  $K_M$ -Wert und durch erhöhten Substratumsatz äußert.<sup>[46]</sup> Ebenfalls kann die mittels FP-Assay quantifizierte, superadditive Bindung und Inhibition von Peptidaldehyden mit Aminen als Bildung solcher

Thioaminalprodukte interpretiert werden.<sup>[43,47]</sup> Auch die Bildung von Mannich-Basen, als eine spezielle Form stabiler Aminale, sollte durch Proteintemplat-gesteuerte Reaktionen möglich sein und wird daher momentan von unserer Gruppe näher untersucht.

Außer den Aldehyden wurden in weiteren Beispielen für Templat-gesteuerte Fragmentligationen auch andere C-Elektrophile verwendet, an die Heteronucleophile addiert werden konnten. Beispielsweise gibt es mehrere Berichte zu Thio-Michael-Additionen, bei denen die Produkte in der Regel gut zu isolieren sind. Jedoch kann hier die Reaktion auch reversibel verlaufen, wenn das Produkt die Retro-Addition über eine  $\beta$ -Eliminierung begünstigt.<sup>[46,117]</sup> Alkylierungen sind gewöhnlich komplett irreversibel. In den meisten Fällen wurden zum Erreichen einer möglichst hohen Reaktivität Thiolate als Nucleophile sowie aliphatische Halogenide, Epoxide oder Sulfonate als Elektrophile eingesetzt.<sup>[118–120]</sup> Diese Arbeiten legen nahe, dass auch andere C-Elektrophile im Rahmen von Proteintemplat-gesteuerten Reaktionen nützlich sein könnten. Beispielsweise bieten nucleophile Substitutionen an elektronenarmen Aryleinheiten eine interessante mögliche Ergänzung zum bestehenden Reaktionsrepertoire.

Borsäuren und Boronsäuren wurden ebenfalls als alternative Elektrophile eingesetzt. Mit Diolen als Binucleophile reagieren diese zu Boronateestern als begrenzt stabile Ligationsprodukte.<sup>[59,125]</sup> Ein weiteres bekanntes Beispiel für reversible Reaktionen, die zu stabilen, isolierbaren Produkten führen, sind die Disulfidbildung und Disulfidaustauschreaktionen.<sup>[101–107]</sup> Die letztgenannten Reaktionen nutzen Thiolate als Nucleophil unter leicht basischen, nichtreduzierenden Bedingungen. Über eine ähnliche Austauschreaktion von Thiolaten wurde für Thioester berichtet.<sup>[33,55,82,108–110]</sup> Reaktionen zur Bildung von C-C-Bindungen sind als Templat-gesteuerte Reaktionen von besonderem Interesse, da sie die Auswahl und Diversität von zugänglichen Ligationsprodukten enorm erhöhen könnten. Bisher sind jedoch nur wenige Beispiele bekannt. In einer Arbeit von Ramström et al. konnte eine reversible, Templat-gesteuerte Henry-Aldol-Addition von Nitroalkanen mit Aldehyden demonstriert werden.<sup>[56]</sup> Dabei konnte gezeigt werden, dass der gebildete sekundäre Alkohol mit den besten Bindungseigenschaften im Assay bevorzugt vom verwendeten Zielprotein, einer Lipase, acyliert wurde. Obwohl bisher keine weiteren Veröffentlichungen im Bereich der Templat-gesteuerten Aldol-Reaktionen erschienen sind, sollte sich dieser Reaktionstyp gut für einen Einsatz als Fragmentligrationsreaktion eignen, besonders in Anbetracht der detaillierten Literatur über Aldolreaktionen in Wasser und unter milden Reaktionsbedingungen.<sup>[56,111,116,128]</sup> Ebenfalls konnten Additionen von Cyaniden und Isocyaniden in Wasser demonstriert werden, was vermuten lässt, dass auch die Passerini- und Ugi-Reaktion als Proteintemplat-gesteuerte Reaktionen möglich sind. Selbiges gilt für C-C-Knüpfungen mittels Alken- und Alkinmetathesen, deren Anwendung auch in Wasser möglich war.<sup>[112–115]</sup>

Klassische Beispiele für irreversible Templat-gesteuerte Reaktionen konnten für dipolare Cycloadditionen gezeigt werden, sowohl in Form von Azid-Alkin-Ligationen, die 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole als Reaktionsprodukte liefern,

als auch in Form der Sulfonylhydrazid-Thioester-Ligationen, die Sulfonylhydrazid über ein cyclisches Intermediat generieren.<sup>[24,25,76,118–124]</sup> Hier ist es offensichtlich, dass zahlreiche andere auf Cycloadditionen basierende Ligationen ebenfalls für Templat-gesteuerte Reaktionen eingesetzt werden könnten.

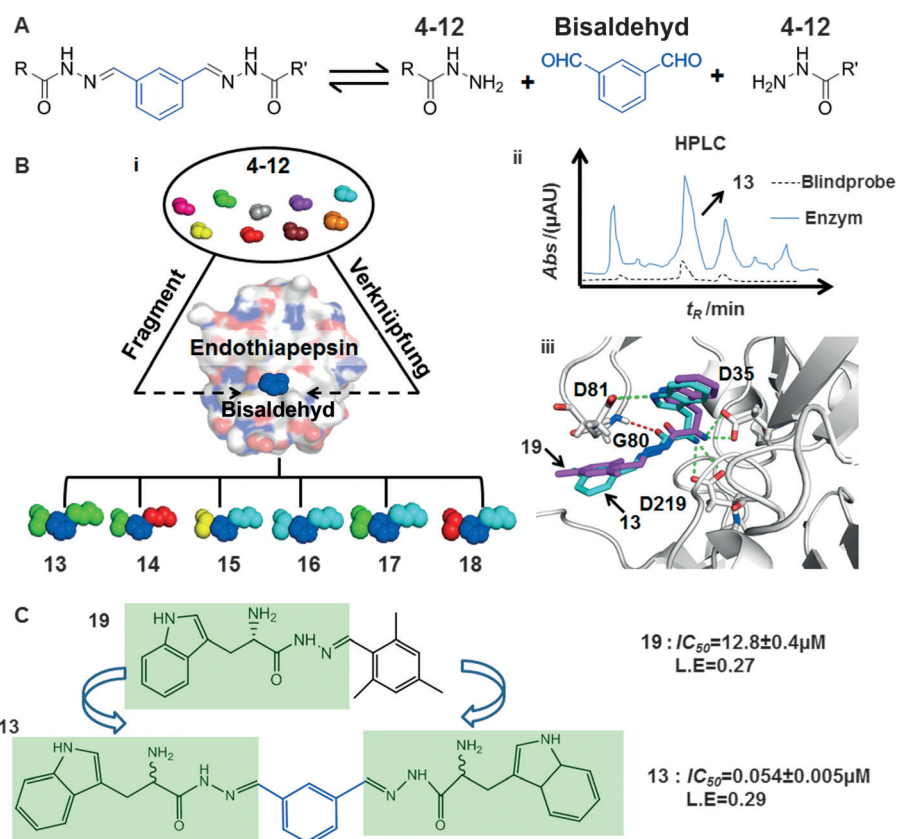
Über Cycloadditionen hinausgehend wurden irreversible Ligrationsreaktionen bislang wenig untersucht, und weitere Ergänzungen sind notwendig, um Ligrationsprodukte zu erhalten, die einen größeren Teil des biologisch relevanten chemischen Raums abdecken können. Generell werden für eine erfolgreiche Ligation chemoselektive Reaktionen benötigt, die in wässriger Lösung ablaufen. Idealerweise sollte bei der Reaktion ein Linker zwischen den beiden Fragmenten gebildet werden, der die Bindung unterstützt oder sie zumindest nicht behindert. Zum Beispiel ergab eine Strukturanalyse des World Drug Index (einer Datenbank von Molekülen mit erwiesener Bioaktivität) ergab, dass Amidbindungen besonders häufig als Linker in bioaktiven Verbindungen vorkommen.<sup>[129]</sup> Daher ist eine Proteintemplat-gesteuerte Amidierungsreaktion von Fragmenten eine besonders nützliche Erweiterung des Reaktionsrepertoires. Kürzlich wurde die erste Proteintemplat-gesteuerte Amidierung ohne Hintergrundreaktion entdeckt.<sup>[48]</sup> Andere Reaktionstypen, die die Möglichkeiten von Fragmentligationen erheblich erweitern würden, sind solche, die Fragmente verknüpfen können, ohne dass ein Linker im Produkt zurückbleibt. Dies ist z. B. der Fall bei Kreuzkupplungen sowie Reaktionen, die anstelle einer klassischen Linker-Struktur einen Heterocyclus als Verbindung zweier Fragmente bilden.

### 5. Praktische Beispiele und Anwendungen von Fragmentligationen

Nachdem wir Fragmentligationsreaktionen definiert haben und ihren biophysikalischen Hintergrund sowie sinnvolle Detektionsstrategien und zugrundeliegende chemische Transformationen erläutert haben, konzentrieren wir uns nun auf die Anwendung des Konzepts für die Entdeckung und Optimierung von Proteinliganden. Zu Beginn werden wir Arbeiten zu reversiblen Ligrationsreaktionen vorstellen, gefolgt von denen zu irreversiblen.

Zahlreiche der ersten Anwendungen von reversiblen, Templat-gesteuerten Fragmentligationen wurden für dynamisch-kombinatorische Bibliotheken (DKBs) gezeigt. Als jüngeres repräsentatives Beispiel für diese Methodik wollen wir Arbeiten der Gruppe von Hirsch hervorheben.<sup>[36,98]</sup> Als Zielprotein und zugleich Modellenzym für andere Aspartatproteasen verwendeten die Autoren Endothiapepsin. Aus neun Hydraziden (4–

12) und einem Bisaldehyd wurde eine dynamische Bibliothek zusammengestellt, die auf zwei zuvor gefundenen Fragment-Hits basierte,<sup>[36]</sup> die in benachbarte Bindungstaschen des Endothiapepsins binden (Abbildung 9).<sup>[98]</sup> Um die Analytik zu vereinfachen, wurden zwei Sub-Bibliotheken (DKB-1 und DKB-2) mit vier bzw. fünf Hydraziden gebildet. Umkehrphasen-HPLC und LC-MS wurden verwendet, um die Templat-gesteuerte Bildung des Bisacylhydrazon-Ligationsprodukts in Gegenwart des Endothiapepsins nachzuweisen. Von den möglichen 78 Bisacylhydrazonen und zwölf Monoacylhydrazonen zeigten nur sechs der möglichen Fragmentkombinationen eine deutliche Verstärkung des HPLC-Signals in Gegenwart des Endothiapepsin-Templats. Zwei der gefundenen Kombinationen, **13** und **16**, wurden nachsynthetisiert und in einem Fluoreszenz-basierten biochemischen Assay getestet. Beide stellten sich dabei als aktiv heraus, und der beste Inhibitor, **13**, zeigte eine 240-fache höhere Potenz als die Ausgangsfragmente, womit ein erfolgreiches Beispiel einer Drei-Fragmente-Ligation vorgestellt wurde. Diese Arbeit demonstrierte, dass die Templat-gesteuerte Fragmentverknüpfung (im Vergleich zu anderen Methoden für die Fragmentoptimierung, z. B. Fragmentvergrößerung oder Fragmentverschmelzung) besonders für die Identifizierung



**Abbildung 9.** Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen unter Anwendung einer dynamisch-kombinatorischen Bibliothek.<sup>[98]</sup> A) Isophthalaldehyd und neun Hydrazide 4–12 bilden bis zu 81 Bisacylhydrazone. B) i) Das Modellprotein Endothiapepsin wirkt auf die DKB ein, um so potenzielle Inhibitoren verstärkt zu bilden. B ii) HPLC-Analyse der Templat-gesteuerten und nicht-Templat-gesteuerten Reaktion zeigt deutlich erhöhte Bildung von **13** in Gegenwart des Enzyms. B iii) Bindungsmodi von **19** (violett) und **13** (cyan), aufgeklärt mittels Röntgenkristallographie (PDB-IDs: 4KUP bzw. 5HCT). C) Die beste Fragmentkombination **13** zeigt eine 240-fache Erhöhung der Potenz bei gleichzeitig erhöhter Ligandeneffizienz gegenüber jener des Ausgangsfragments **19**.

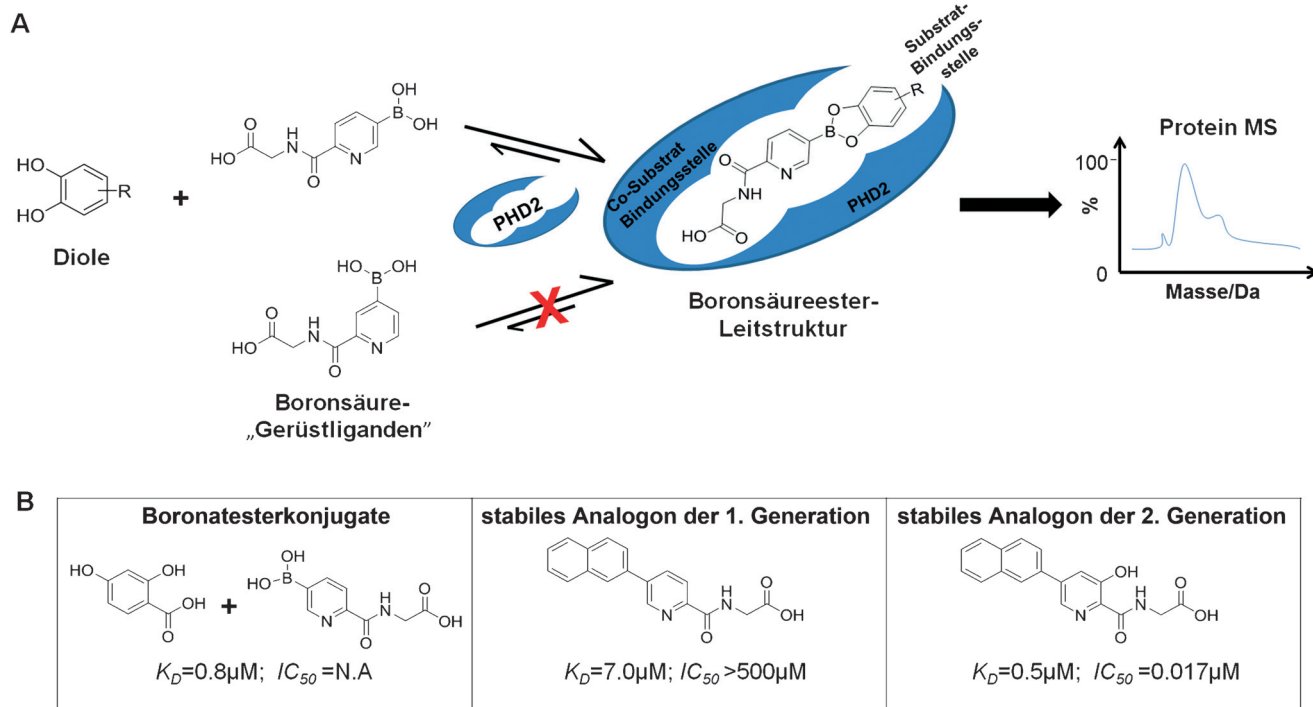
additiver Fragmentkombinationen geeignet ist, in denen die Ligandeneffizienz der kombinierten Fragmente nicht nur beibehalten wird, sondern sich sogar erhöht. Die Schwierigkeit des Ansatzes bestand darin, unter Erhaltung der Bindungsmodi der Fragmente einen geeigneten Linker zu finden, der zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Zielprotein ermöglicht. Trotz dieser positiven Ergebnisse zeigt der Artikel auch die Grenzen von DKB auf, nämlich die mühsame Analyse von komplexen kombinatorischen Bibliotheken, der hohe Proteinverbrauch und die Beschränkung auf wenige dynamische Reaktionen, die nicht-wirkstoffähnliche Produkte liefern, wie Acylhydrazone.

Die gleichen Grenzen werden durch Claridge et al. verdeutlicht, die im Zuge eines DKB-Experiments  $^{11}\text{B}$ -NMR-Spektroskopie zur Detektion von Serinprotease-Inhibitoren einsetzten.<sup>[59]</sup> Zur Entwicklung der Methode verwendeten sie  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha\text{CT}$ ) als Modellenzym und untersuchten die Ligation von Boronsäuren mit Zuckern, um verbesserte Enzyminhibitoren zu bilden. Die Bildung der tertiären Komplexe aus Enzym, Boronsäure und Zuckerdiol wurde mittels  $^{11}\text{B}$ -NMR- und  $^1\text{H}$ -WaterLOGSY-NMR-Spektroskopie (WaterLOGSY = Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy) analysiert. Diese Ergebnisse spornten die Gruppen von Schofield und Claridge dazu an, native Massenspektrometrie einzusetzen, um Hits aus einer DKB zu identifizieren. Reversibel gebildete Boronatester wurden als Inhibitoren der Prolyl-Hydroxylase-Domäne 2 (PHD2) identifiziert, eines Enzyms aus der Familie der 2-Oxoglutarat(2OG)-abhängigen Oxygenasen (Abbildung 10).<sup>[130]</sup> PHD2 ist eine  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -haltige 2-OG-Oxygenase, die eine Rolle bei der

Regulation der menschlichen Hypoxie-Antwort spielt, und ist damit ein geeignetes Zielprotein zur Behandlung von anämischen und ischämischen Krankheitsbildern.

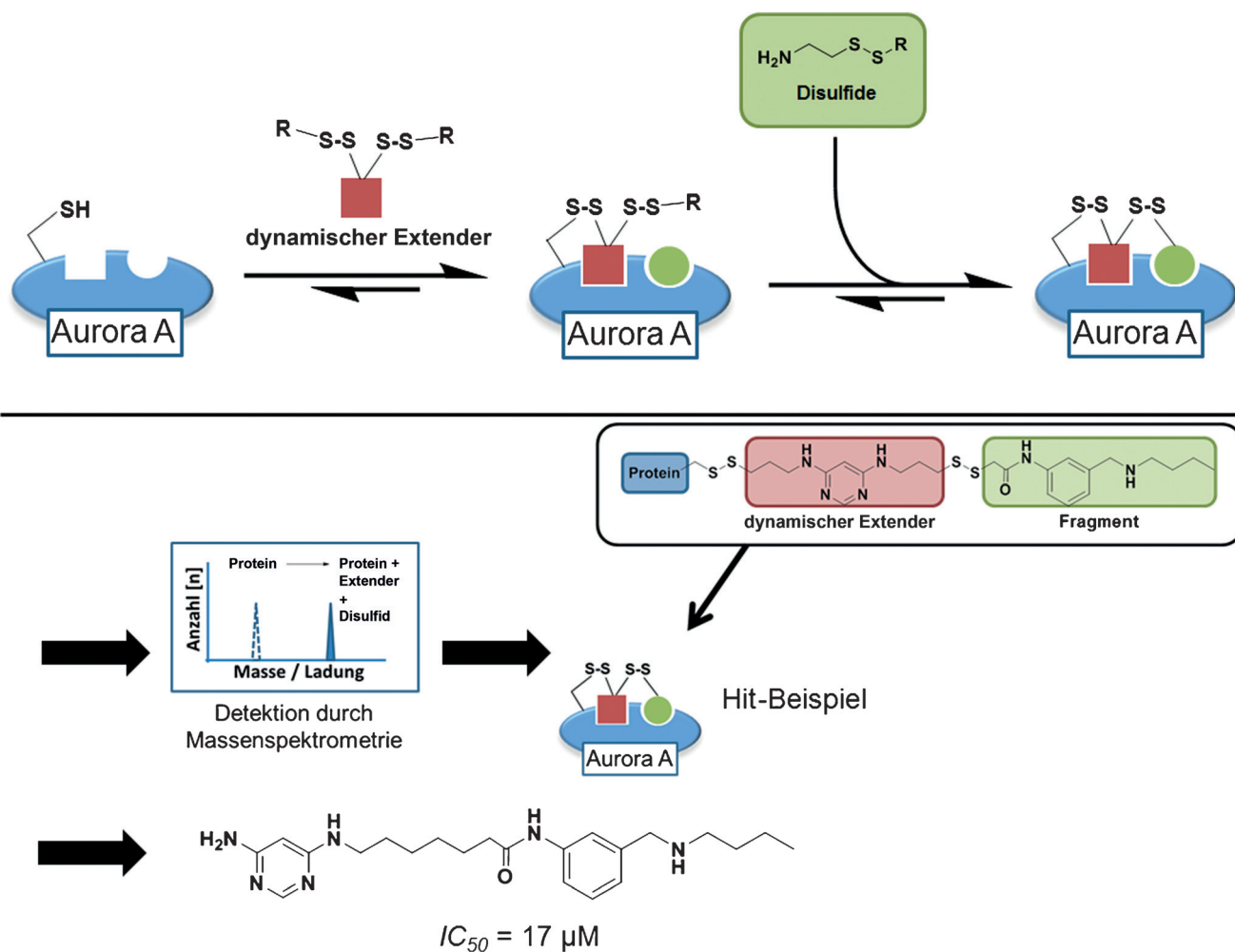
In den Experimenten wurde ein heterocyclisches,  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -bindendes Boronsäurefragment mit mehreren Gruppen von Diol-Liganden inkubiert und im Anschluss mittels nativer MS analysiert. Die am besten bindenden Fragmentkombinationen wurden durch eine Zunahme der Proteinmasse identifiziert und anschließend über eine Suzuki-Kreuzkupplung in stabile, Bor-freie Inhibitoren überführt, die Aktivitäten bis hinab in den nanomolaren Bereich aufwiesen. Die Ergebnisse des Fragmentligationsassays konnten in einer Folgestudie mit einer  $^1\text{H}$ -NMR-basierten Methode bestätigt werden.<sup>[131]</sup>

Der „tethering approach“ ist ein klassisches Beispiel für reversible, Templat-gesteuerte Fragmentligationen unter Anwendung von Disulfid-Austauschreaktionen.<sup>[132]</sup> Die Methode nutzt die auf der Proteinoberfläche stattfindende, reversible Disulfid-Austauschreaktion zwischen natürlichen oder künstlich eingefügten Cysteinresten und einem Disulfidhaltigen, niedermolekularen Fragment in Lösung. In einer Weiterentwicklung der Methode wurden durch die Gruppe von Erlanson so genannte Extender, also Erweiterungsgruppen, eingeführt, was nochmals zu einer deutlichen Ausdehnung der Einsatzmöglichkeiten im Rahmen von Fragmentligationen führte.<sup>[133]</sup> 2008 berichtete die Gruppe über ein Inhibitor-Screening mit der Aurorakinase als Zielprotein (Abbildung 11).<sup>[134]</sup> Der erste Schritt bestand darin, einen Cysteinrest in der Nähe der ATP-Bindungsstelle einzuführen. Als Nächstes wurde ein dynamischer Extender synthetisiert, der aus zwei Disulfidresten und einem Diaminopyridin be-



**Abbildung 10.** A) Bildung von Boronsäure/Boronatester-Leitstrukturen innerhalb einer dynamisch-kombinatorischen Bibliothek aus Diolen und Boronsäuren in Gegenwart des Proteintemplats PHD2.<sup>[130]</sup> B) Identifizierung von potenten Boronatester-Konjugaten mittels Boronsäure-„Gerüstliganden“ führt zur Entdeckung der ersten und zweiten Generation von stabilen Analoga, die PHD2-Aktivität bis hinab in den nanomolaren Bereich zeigen.



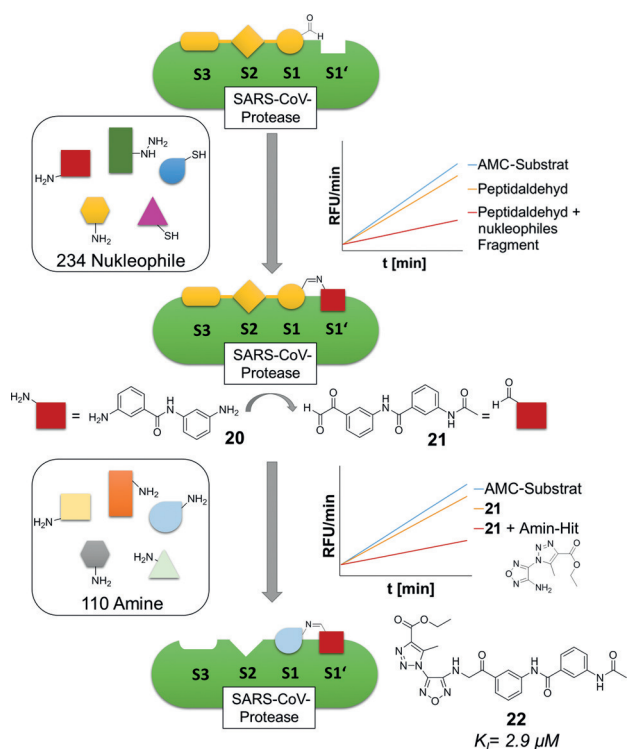


**Abbildung 11.** Der „tethering approach“ mit dynamischen Extendern wurde eingesetzt, um ein Screening von Aurorakinase-bindenden Fragmenten durchzuführen.<sup>[134]</sup>

stand, das ein bekannter Ligand der Purinbindungsstelle ist. Einer der Disulfidreste konnte an der eingeführten Cysteinsseitengruppe angreifen, der andere konnte ein sekundäres Disulfidfragment binden. Sobald dieses sekundäre Fragment mit der adaptiven Region des Proteins in der Nähe des Extenders wechselwirkte, wurde eine thermodynamisch stabilisierte Disulfidbindung gebildet. Dieser stabilisierte Komplex konnte anschließend durch die Veränderung der Proteinmasse per Massenspektrometrie detektiert werden. Es wurde eine Bibliothek mit ca. 4500 Disulfidfragmenten in Gruppen von jeweils zehn Fragmenten durchmustert, was zur Identifizierung mehrerer Fragmentkombinationen führte. Geringfügige Modifikationen der jeweiligen Fragmente resultierten in der Bildung eines stabilen Inhibitors mit Affinität im mikromolaren Bereich. Ein ähnlicher Ansatz wurde bei einer anderen Kinase, der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isozym 1 (PDK1), eingesetzt. Der Extender wurde in diesem Fall jedoch über eine irreversible Alkylierung am Zielprotein befestigt.<sup>[135]</sup>

Dynamisches Ligationscreening wurde 2008 eingeführt, um die Detektionsgrenzen und Einschränkungen von kombinatorischen Methoden wie DKB zu überwinden. Die erste

Bioaktivitäts-basierte Detektion von reversibel gebildeten Fragmentligationen konnte an der SARS-Coronavirus-Hauptprotease (SARS CoV M<sup>pro</sup>) gezeigt werden (Abbildung 12).<sup>[43]</sup> SARS CoV M<sup>pro</sup> ist eine vom Virus kodierte Cysteinprotease, die essenziell für die Virusreplikation innerhalb der infizierten Wirtszellen ist und deren Inhibitoren sich daher zum Einsatz als mögliche Virustatika eignen.<sup>[136,137]</sup> Da die Protease definierte Bindungstaschen zur Unterbringung von Peptidseitenketten enthält, war es möglich, einen Peptid-aldehydinhibitor zu entwickeln, der seine elektrophile Aldehydgruppe direkt am aktiven Zentrum der Protease positioniert. Durch Dynamisches Ligations-Screening einer Fragmentbibliothek von 234 Nucleophilen konnten einige Fragment-Hits identifiziert werden, die in der S1'-Bindungstasche binden und  $K_I$ -Werte im millimolaren Bereich aufweisen konnten. Der beste Fragment-Hit wurde anschließend in ein entsprechendes Aldehydfragment umgewandelt und einem weiteren Screening mit einer Aminbibliothek unterzogen. Dies führte zur Entdeckung eines sekundären Hit-Fragments, das in der S1-Bindungstasche des Enzyms bindet. Lediglich zwei Durchläufe eines dynamischen Ligations-Screenings, ausgehend von einem peptidischen Inhibitor,



**Abbildung 12.** Entwicklung eines Fragment-basierten, nichtpeptidischen SARS-CoV-M<sup>Pro</sup>-Inhibitors ausgehend von einem Peptidaldehyd. Dynamisches Ligations-Screening einer Nucleophilbibliothek führte zur Entdeckung von Aminfragment 20, das in der S1'-Bindungstasche der Protease bindet. Amin 20 wurde zum Elektrophil 21 umgewandelt, das im nächsten Screening-Durchlauf zur Entdeckung eines sekundären Hit-Fragments führte. Die reaktive Aminierung von Fragment 21 und dem besten Amin-Hit aus dem Sekundär-Screening lieferte Inhibitor 22.

fürten zur Selektion von zwei millimolar aktiven, niedermolekularen Fragmenten, deren kovalente Verknüpfung durch reduktive Aminierung zu einem komplett nichtpeptidischen Inhibitor der SARS CoV M<sup>Pro</sup> mit einem  $K_I$ -Wert von  $2.9 \mu\text{M}$  führte.

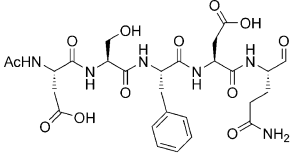
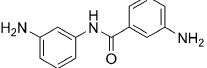
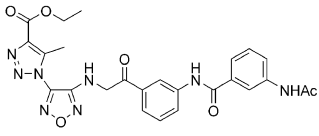
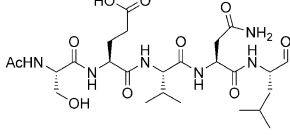
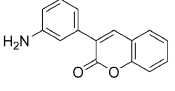
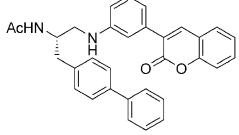
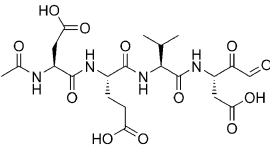
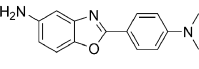
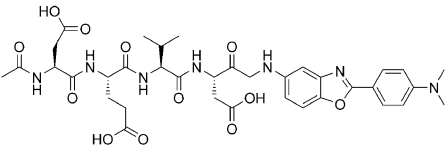
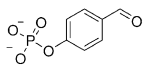
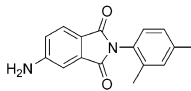
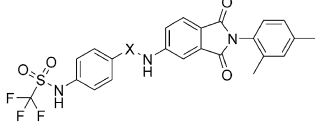
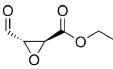
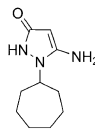
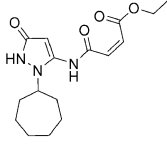
Weitere Beispiele von Bioaktivitäts-basierten, dynamischen Ligationsassays sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Caspase 3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Apoptose von Zellen und ist damit ein mögliches Zielprotein für Medikamente zur Behandlung von traumatischen Hirnverletzungen, amyotropher Lateralsklerose sowie der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit. Das Protein wurde mit einem nanomolaren Fluorophor-markierten Peptidylketoaldehyd und insgesamt 7397 Fragmenten getestet, einschließlich 4019 nukleophiler, primärer Amine. Das Screening wurde mithilfe eines Fluoreszenzpolarisations-Bindungsassays in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen durchgeführt. Dabei konnte für die meisten getesteten Fragmente keine Änderung des FP-Signals festgestellt werden. 78 Fragmente zeigten jedoch ein gegenüber der Kontrollmessung reduziertes Signal (negative Kooperativität), und bei 176 Fragmenten konnte ein signifikant erhöhtes FP-Signal (positive Kooperativität) erhalten werden. 21 Fragmente konnten dabei als kompetitive Inhibitoren von Caspase 3 mit  $K_I$ -Werten von  $<10 \mu\text{M}$  bestätigt werden. Das beste kooperativ bindende

Fragment, B, wurde durch reduktive Aminierung kovalent mit Fragment A verknüpft und lieferte einen potenten Caspase-3-Inhibitor mit einem  $K_I$ -Wert von  $80 \text{ pM}$ .

Dynamische Ligationsassays wurden darüber hinaus für das Screening der sekundären Bindungsstellen von vier nahe verwandten Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPs) eingesetzt: von menschlicher PTP1B, PTPN7, PTPN12 (= SHP2) und mykobakterieller MPTPA.<sup>[45]</sup> Generell gilt die Entwicklung von spezifischen PTP-Inhibitoren als anspruchsvolle Aufgabe, und es wird bezweifelt, ob sich diese physiologisch so relevante Enzymklasse überhaupt als Zielprotein für neue Wirkstoffe eignet. Unter Verwendung von 4-Formylphenylphosphat als elektrophilem PTP-Substrat und einer kleinen, aus 110 primären Aminen bestehenden Fragmentbibliothek konnten jedoch spezifische Fragmente für sekundäre Bindungsstellen jedes der getesteten PTPs gefunden werden. Die spezifischen Fragmente der PTPs wurden durch einen Substratverstärkungsassay detektiert (Abbildung 7B): Aktive Fragmente bilden dabei ein Ligationsprodukt mit dem PTP-Substrat, was zu einer erhöhten Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes führt und damit einen herabgesetzten  $K_M$ -Wert zur Folge hat. Die durch das Sekundärfragment verbesserte Substraterkennung führte zu einer verstärkten Freisetzung von Phosphationen, die anschließend in einem Malachitgrünassay quantifiziert werden konnten. Durch Austausch des Phenylphosphats gegen ein nichtspaltbares Phosphotyrosin-Mimetikum und anschließende kovalente Verknüpfung mit dem gefundenen MPTPA-spezifischen Aminfragment konnten Inhibitoren der Protein-Tyrosin-Phosphatase A aus *Mycobacterium tuberculosis* (MPTPA) gefunden werden, die keine Aktivität gegen die drei anderen PTPs aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Adressierung der sekundären Bindungsstellen der PTPs mit spezifischen Fragmenten die Entwicklung von selektiven PTP-Inhibitoren ermöglicht.

Das dynamische Ligations-Screening konnte auch auf Aspartylproteasen ausgeweitet werden, wobei hier ein FRET-Assay verwendet wurde.<sup>[44]</sup> Ein Peptidaldehyd wurde als dirigierende Sonde eingesetzt, um Fragmente zu identifizieren, die im aktiven Zentrum der Aspartylprotease- $\beta$ -Sekretase (BACE-1) binden. Dieses Enzym wurde als Hauptursache für die vermehrte Ablagerung von Amyloid- $\beta$ -Peptiden identifiziert, eines der wichtigsten pathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit. Daher gab es erhebliche Bemühungen, BACE-1-Inhibitoren für eine mögliche Behandlung der Alzheimer-Krankheit zu entwickeln. Anstelle der reversiblen Halbthioacetalbildung wurde in diesem Fall die Hydratform des Aldehyds gebildet, die über Wasserstoffbrücken dazu in der Lage ist, die Aspartatreste der katalytischen Diade zu binden. Durch dynamische Ligation des Peptidaldehyds mit einem Aminnucleophil konnten so reversibel Iminprodukte gebildet werden. Der Peptidaldehyd, der als kovalenter, chemisch reaktiver Inhibitor (CRI) wirkte, offenbarte 3-(3-Aminophenyl)-2H-chromen-2-on als kompetitiven Inhibitor von BACE-1. Das identifizierte 3-(Aminophenyl)cumarin-Fragment wurde als Startpunkt zur Hit-Optimierung verwendet und führte zur Entwicklung eines im niedrigen mikromolaren Bereich aktiven ( $K_I = 3.7 \mu\text{M}$ ) BACE-1-Inhibitors. Eine weitere Anwendung der

**Tabelle 2:** Anwendung von Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen im Rahmen von dynamischen Ligations-Screening-Experimenten.<sup>[a]</sup>

Protein	Startligand	Hit-Fragment	Fragmentkombination	Lit.
SARS CoV M <sup>pro</sup>	 11 μM	 > 1 mM	 2.9 μM	[43]
BACE-1	 20.7 μM	 146 μM	 3.7 μM	[44]
Caspase-3	 25 nM	 120 μM	 0.08 nM	[47]
MPTPA	 $K_M = 515 \mu\text{M}$	 > 500 μM	 X(C=O): 13 μM X(CH <sub>2</sub> ): 11 μM	[45]
CB3-3CV-Protease	 $k_{\text{inact}}/K_I = 2.36 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	 > 1 mM	 $k_{\text{inact}}/K_I = 606 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	[85]

[a] Werte entsprechen, wenn nicht anders angegeben, den ermittelten  $K_I$ -Werten.

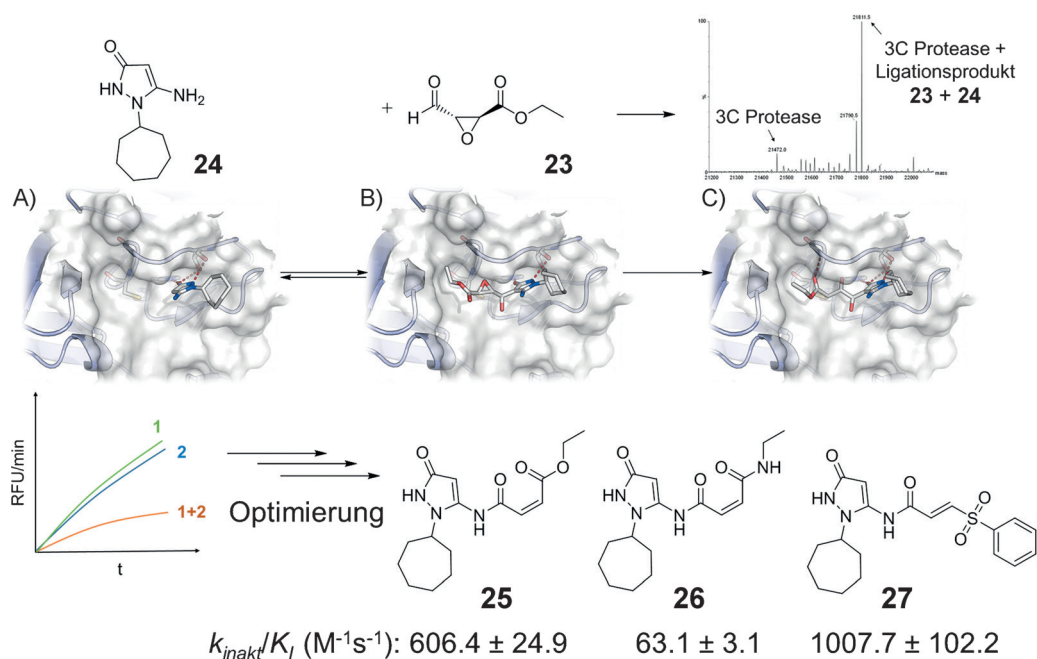
Bioaktivitäts-basierten Detektion wurde kürzlich für die Aspartylprotease Endothiapepsin berichtet.<sup>[64]</sup>

In der jüngsten Arbeit konnten reversible Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen auf die Entdeckung von irreversiblen Inhibitoren der enteroviralen Proteasen ausgeweitet werden (Abbildung 13).<sup>[85]</sup> Dabei wurde Epoxyaldehyd **23**, der eine modifizierte Partialstruktur des bekannten Cysteineproteaseinhibitors E-64 darstellt, als ein schwacher, irreversibler Inhibitor der 3C-Protease des Coxsackie-3B-Virus mit einer Bibliothek von 850 primären Aminfragmenten getestet. 5-Aminopyrazolon **24** wurde als Fragment-Hit entdeckt, der in Kombination mit dem Epoxyaldehyd zu einer superadditiven Inhibition sowie zur kovalenten Modifizierung der Protease führte. Mehrfache Optimierung des Ligationsprodukts von **23** und **24** führte schließlich zu im sub-mikromolaren Bereich aktiven Breitbandinhibitoren enteroviraler Proteasen, die zu einer 300- bis 500-fachen Beschleunigung der Desaktivierung des Proteins führen, ohne dass signifikante Kreuzreaktivitäten mit nichtviralen Proteasen beobachtet wurden.

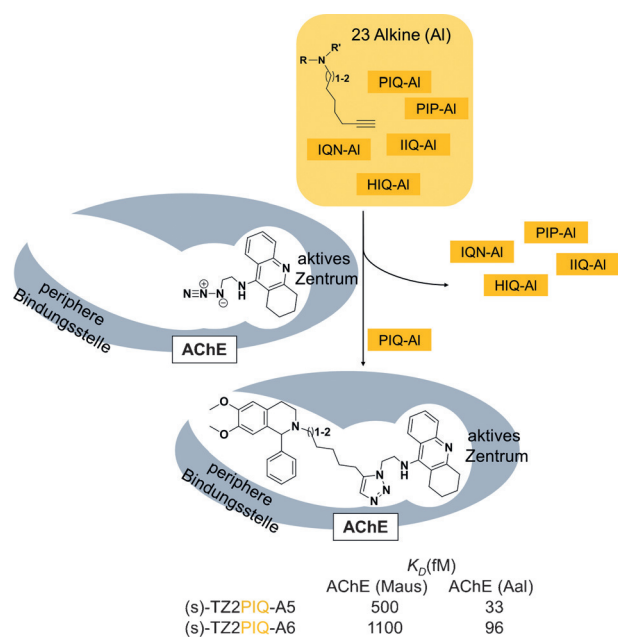
Im Bereich der irreversiblen Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen wurden erste Studien durch die Gruppe von Sharpless durchgeführt und als „target-guided synthesis“ bezeichnet. Die Autoren nutzten die dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen für In-situ-Klick-Reaktionen, die Templat-gesteuert durch das Protein Acetylcholinesterase (AChE) waren.<sup>[30]</sup> AChE ist ein Zielprotein bei der Behandlung der Alzheimer-Krankheit. In einer Folgearbeit aus dem Jahr 2005 wurde die Methode erneut am gleichen Zielprotein angewendet, um eine Fragmentkombination zu finden, die sowohl das aktive Zentrum als auch eine periphere Bindungsstelle besetzt (Abbildung 14).<sup>[123]</sup>

Als Startpunkt wurde der etablierte, im aktiven Zentrum des Enzyms bindende AChE-Inhibitor Tacrin verwendet. In die Struktur von Tacrin wurde zunächst eine Azidgruppe eingeführt. Anschließend wurde eine Auswahl von 23 terminalen, an der peripheren Bindungsstelle bindenden Alkinfragmenten auf die Entstehung von 1,2,3-Triazolprodukten über dipolare Cycloaddition getestet. Erste LC-MS-Messungen konnten den Templateffekt des Proteins auf die Ligation





**Abbildung 13.** Entdeckung von irreversiblen Inhibitoren der Coxsackie-Virus-B3-3C-Protease durch Anwendung von reversiblen Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen.<sup>[85]</sup> Das nucleophile Amin-Fragment **24** bindet in der S1-Tasche des Enzyms (A) und bildet mit dem bi-elektrophilen Warhead **23** ein reversibles Fragmentligationsprodukt (B). Anschließend wird das Epoxid durch Angriff der Cysteine-Seitenkette im aktiven Zentrum gespalten, was mittels LC-MS nachgewiesen werden konnte (C). Das Ligationsprodukt zeigt im FRET-Assay einen stark überadditiven inhibitorischen Effekt und wurde daraufhin zu einem potenten Breitspektrum-inhibitor von enteroviralen und rhinoviralen 3C-Proteasen optimiert.



**Abbildung 14.** Entwicklung von AChE-Inhibitoren durch Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligation.<sup>[123]</sup> Der AChE-Inhibitor Tacrin wurde durch Einführung einer Azidgruppe modifiziert und fungiert so als Verankerungsmolekül im aktiven Zentrum des Proteins. Gruppen verschiedener Alkine wurden zugegeben, und mittels Templat-gesteuerter Reaktionen konnten zwei hochpotente *syn*-1,2,3-Triazole erhalten werden.

der gebundenen Fragmente bestätigen. Nur in Gegenwart des Proteins wurden 1,5-disubstituierte (*syn*-)Triazole gebildet, und dies mit nur geringer oder gar nicht vorhandener Hintergrundreaktion.

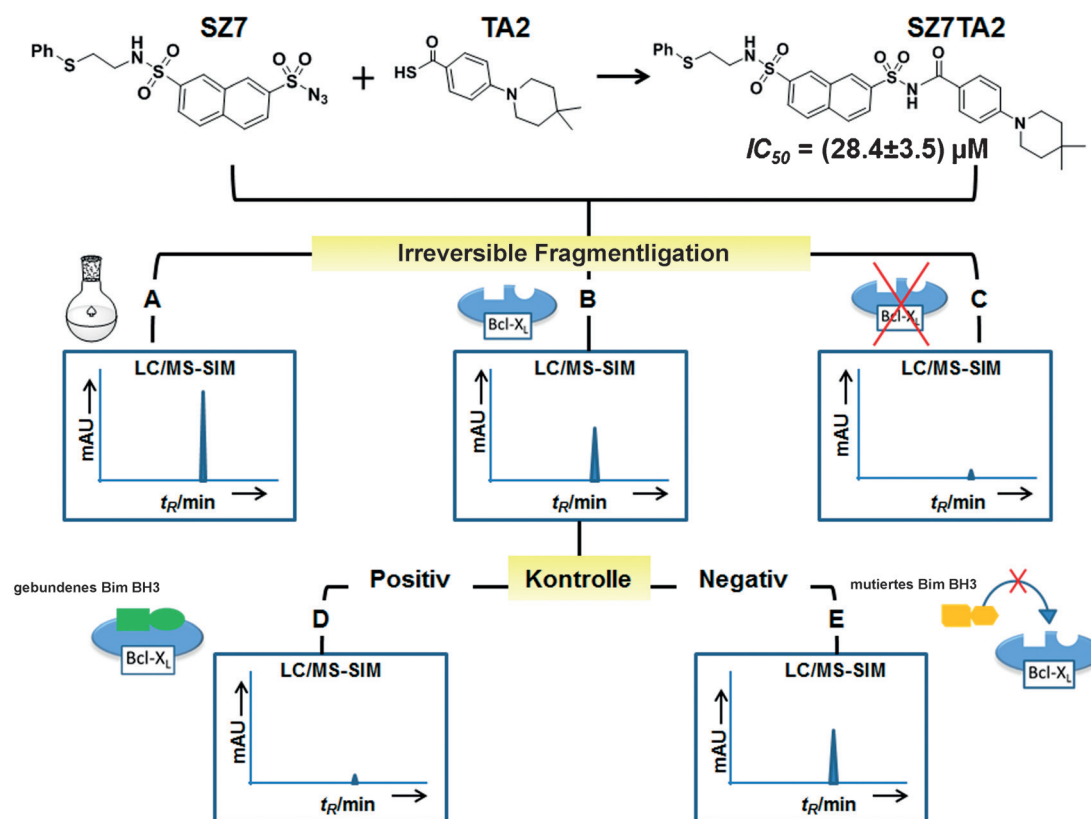
Nachdem die Reaktion von einzelnen Fragmentpaaren hatte bestätigt werden können, wurden im Anschluss Gemische von bis zu zehn Alkinen gleichzeitig getestet. Tatsächlich konnte auch hier das Proteintemplat die Bildung von hochpotenten Fragmentkombinationen induzieren, die Dissoziationskonstanten im niedrigen pikomolaren, oder sogar im femtomolaren Bereich aufweisen konnten.

Azid-Alkin-Ligationen wurden auch auf andere Zielproteine angewendet.<sup>[76,121–125,138]</sup> So ließ sich z. B. die Bildung eines bekannten, nanomolar aktiven HIV-Protease-Inhibitors mit *anti*-substituierter 1,2,3-Triazolstruktur in Gegenwart des Enzyms beschleunigen.<sup>[138]</sup> In diesem Fall lief die Reaktion gegenüber der Bildung der piko- oder femtomolaren AChE-Inhibitoren erheblich langsamer ab, und es wurde auch eine deutliche Hintergrundreaktion zum *syn*-Triazol beobachtet. Proteintemplat-gesteuerte Azid-Alkin-Klick-Reaktionen wurden auch für die Tyrosinkinase ABL1 demonstriert.<sup>[121]</sup> Fukase et al. zeigten die Templat-gesteuerte Bildung von funktionsfähigen Mimetika der Grb2-SH2-Domäne, die in vitro das Wachstum von Krebszellen hemmten.<sup>[76]</sup> Um den besten Inhibitor mittels Templat-gesteuerter Ligation von Azid- und Alkinfragmenten zu erhalten, ist es essenziell, dass die Reaktion unter vollständiger Abwesenheit von Kupferionen abläuft. Die Gruppen von Miyata und Finn berichteten von einer In-situ-Synthese eines Inhibitors der Histon-Desacetylase 8 (HDAC-8) ausgehend von einem Alkinfragment, das eine Hydroxamsäurestruktur enthält, und einem Azidfragment.<sup>[122]</sup> Überraschenderweise wurde hierbei jedoch bei weitem nicht der beste Inhibitor gebildet, sondern ein gegenüber dem *syn*-Triazol weniger aktives, 1,4-disubstituiertes *anti*-Triazol. Eine gründliche Untersuchung dieser Befunde

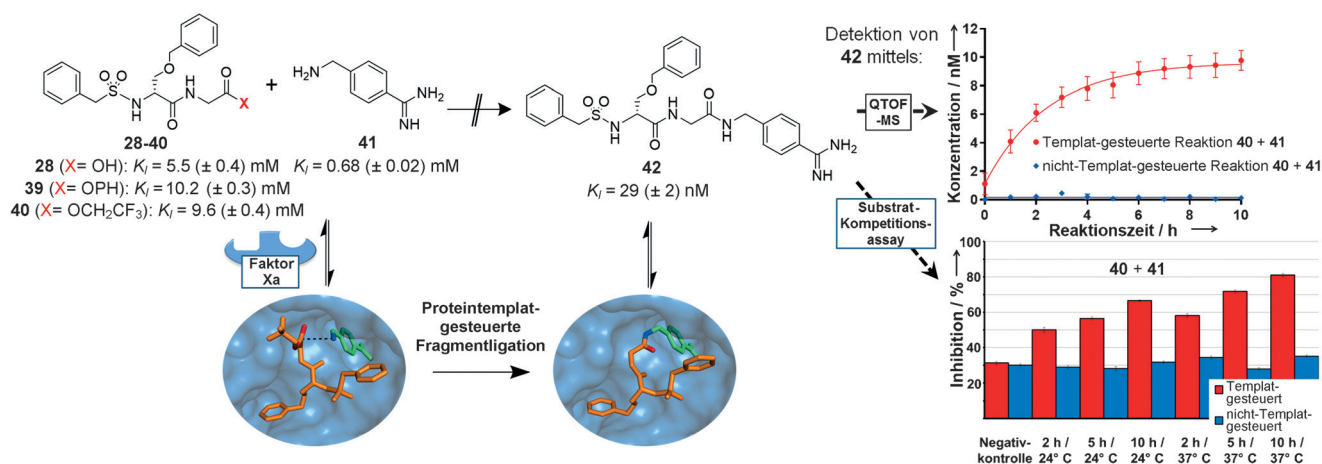
ergab, dass der Reaktionsansatz Spuren von  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -Ionen enthielt, die an der Metallbindungsstelle von HDAC-8 gebunden waren und dafür ausreichten, die Reaktion zum weniger bevorzugten Cycloadditionsprodukt zu katalysieren.

Über Azid-Alkin-Ligationen hinaus wurden auch andere dipolare Cycloadditionen untersucht. Reaktionen von Thio-säuren mit Sulfonylazidfragmenten, die über einen cyclischen Übergangszustand Acylsulfonamide generieren, liefern besonders gelungene Beispiele und wurden als Sulfo-Klick-Reaktionen bezeichnet. 2011 konnten Manetsch et al. diese Reaktion in Form einer Proteintemplat-gesteuerten, irreversiblen Ligation an einem besonders anspruchsvollen Ziel demonstrieren: der PPI-Domäne des Bcl- $\text{X}_\text{L}$ -Proteins.<sup>[120]</sup> Die Interaktion von Bcl- $\text{X}_\text{L}$  mit dem BH3-Peptid ist ein entscheidender Schritt in der Regulation des programmierten Zelltods (Apoptose). Inhibitoren dieser Interaktion könnten sich als wirksame Krebstherapeutika herausstellen. Um neue Modulatoren zu finden, wurde daher ein Screening mit Bcl- $\text{X}_\text{L}$  als Templat durchgeführt, in dem die Proteintemplat-gesteuerte Sulfo-Klick-Reaktion eines Sulfonylazids mit einem Thio-säurefragment untersucht wurde (Abbildung 15). Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des mikromolaren Bcl- $\text{X}_\text{L}$ -Inhibitors Templat-gesteuert verlief. Ohne das Protein oder bei Blockade der Bindungstasche durch BH3-Peptid wurde weniger Inhibitor gebildet, während der Zusatz eines inaktiven, mutierten BH3-Peptids keine Auswirkungen hatte.

Vor kurzem wurden Proteintemplat-gesteuerte, irreversible Fragmentligationen für die Bildung von Amidinen (Amidierungen) entwickelt (Abbildung 16).<sup>[47]</sup> Die Bildung von Amidinen gehört zu den wichtigsten Fragmentverknüpfungen in bioaktiven Verbindungen und zugelassenen Wirkstoffen. Eine Kollektion der Aktivester **28–40**, die einen breiten Bereich chemischer Reaktivität abdeckte, wurde mit 4-Aminomethylbenzamidin (**41**) und dem Protein-Faktor Xa, einem Wirkstoffziel der Blutgerinnungskaskade, inkubiert, um Bedingungen für die Templat-gesteuerte Amidierung zu entdecken. Zwei der Aktivesterfragmente, Phenylester **39** und Trifluorethylester **40**, zeigten eine klare Proteintemplat-gesteuerte Amidierung von **41** im Substrat-Kompetitionsassay und im LC-MS und lieferten den nanomolaren Inhibitor **42** ausgehend von zwei schwach bindenden Fragmenten mit millimolaren Bindungsaffinitäten. Der Reaktionsfortschritt der Proteintemplat-gesteuerten Bildung von **42** wurde mittels Extracted-Ion-Chromatographie unter Verwendung eines QTOF-Detektors quantifiziert. Interessanterweise verlief die Reaktion des 1,1,1-Trifluorethylesters **40** ohne detektierbare Hintergrundreaktion und wurde bei einer Sättigungskonzentration des freien Inhibitors **42** von 10 nM auto-inhibiert. Der Inhibitor zeigte eine bemerkenswerte superadditive Erhöhung seiner freien Bindungsenergie (der  $K_\text{I}$ -Wert betrug 29 nM anstelle der erwarteten 3  $\mu\text{M}$  für den additiven Fall), die aus der durch die Fragmentverknüpfung relativ erniedrigten



**Abbildung 15.** Templat-gesteuerte Bildung des Sulfonylazid-Bcl- $\text{X}_\text{L}$ -Inhibitors SZ7TA2 ausgehend vom Sulfonylazidfragment SZ7 und Thio-säurefragment TA2.<sup>[119]</sup> A) Chemisch synthetisierte Referenzverbindung. B) Templat-gesteuerte Reaktion: Fragmente wurden in Gegenwart des Zielproteins inkubiert; Bcl- $\text{X}_\text{L}$  wirkt als Templat für die Bildung von SZ7TA2. C) Hintergrundreaktion: Fragmente wurden ohne Bcl- $\text{X}_\text{L}$  inkubiert; lediglich geringe Mengen des Produkts entstehen. D) Blockierung der Bcl- $\text{X}_\text{L}$ -Bindungsstelle durch das Bim-BH3-Peptid führt zur Unterdrückung der Produktbildung. E) Mutiertes Bim-BH3-Peptid hat nur geringe Affinität zu Bcl- $\text{X}_\text{L}$  und führt daher nicht zur Unterdrückung der Templat-gesteuerten Fragmentligation.



**Abbildung 16.** Proteintemplat-gesteuerte Amidierung des Aktivesters **39/40** mit 4-Aminomethylbenzamidin (**41**) führte zur Bildung des nanomolaren Faktor-Xa-Inhibitors.<sup>[47]</sup> Die Proteintemplat-gesteuerte, hintergrundfreie Reaktion wurde mithilfe eines Bioaktivitäts-basierten Assays gezeigt und die auto-inhibitorische Kinetik der Inhibitorbildung durch QTOF-MS nachgewiesen. Die Kristallstruktur des Protein-Inhibitor-Komplexes ermöglichte es, den sterischen Verlauf der Templat-gesteuerten Reaktion zu erklären.

Bindungsentropie resultierte. Der Protein-Inhibitor-Komplex wurde kristallisiert, und die erhaltene hochaufgelöste Struktur ermöglichte es den Autoren, die Templat-gesteuerte Amidierung im sterischen und mechanistischen Detail zu erklären.

## 6. Diskussion und Ausblick: Gegenwart und Zukunft der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligation

Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen wurden in den letzten Jahren als alternativer und ergänzender Zugang zu bioaktiven Proteinliganden etabliert. Hinsichtlich einiger Aspekte konnten dabei bedeutende Fortschritte erzielt werden. Verbesserte und spezialisierte analytische und bioanalytische Methoden haben zu einer breiten Anwendung und einem tieferen Verständnis der Methode beigetragen. Die Auswahl an möglichen Ligationsreaktionen wurde kontinuierlich erweitert, und weitere Ergänzungen zu den Reaktionen, die Templat-gesteuert Fragmentligationsprodukte liefern, sind zu erwarten. Nachdem nun der biophysikalische Hintergrund, die zugrundeliegende Chemie und tatsächlichen Anwendungen der Methode besprochen wurden, sind wir dazu in der Lage, die Stärken und Grenzen der Methode zu erörtern. Schließlich werden wir einen Ausblick auf die zukünftigen Möglichkeiten und voraussichtlichen Entwicklungen dieser Technik als Teil des Prozesses der Wirkstofffindung geben.

Der größte Vorteil der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen gegenüber anderen Fragment-basierten Methoden ist zweifelsohne die Möglichkeit, ortsgerecht und mit präziser räumlicher Auflösung Fragmente zu identifizieren, die in einer genau definierten Bindungstasche des Proteins binden. Zwar ist es auch mit anderen Fragment-basierten Methoden, z. B. durch den Einsatz der Röntgenkristallographie oder bestimmter NMR-basierter Methoden, möglich, Strukturinformationen zur Bindung eines Liganden zu er-

halten, jedoch kann keine dieser Methoden dazu verwendet werden, Fragmentassays durchzuführen, die spezifisch auf eine Bindungsstelle ausgerichtet sind. Die ortsgerechte Fragmentdetektion wird dabei durch die Struktur und die so definierte Bindungsstelle des reaktiven Startfragments ermöglicht. Der zweite große Vorteil Proteintemplat-gesteuerter Fragmentligationsassays ist ihre Empfindlichkeit, die durch die (super-)additive Bindungsverstärkung von kovalent verknüpften Fragmenten bedingt ist. Als Resultat davon können durch Fragmentligationsassays Fragmente identifiziert werden, die mit anderen Fragment-basierten Methoden zur Wirkstofffindung nicht oder nur bei sehr viel höheren Fragment- oder Proteinkonzentrationen detektierbar sind. Aus diesem Grund kann die Methode Proteinliganden mit alternativen Strukturen und erhöhter Ligandeneffizienz liefern. Ein dritter Vorteil liegt in den praktischen und wirtschaftlichen Vorzügen des Verfahrens, bedingt durch die Integration von Synthese der Fragmentkombinationen und Detektion der Bioaktivität in einem Schritt. Dies führt dazu, dass der Aufwand und die Ressourcen für die chemische Synthese bioaktiver Liganden erheblich reduziert werden, da lediglich die bioaktiven Fragmentkombinationen zur weiteren strukturellen und funktionellen Validierung nachsynthetisiert werden müssen. Während im klassischen Hochdurchsatz-Screening riesige Bibliotheken von Wirkstoff-ähnlichen Molekülen eingesetzt werden, um den chemischen Raum adäquat abzudecken, sind bei Fragmentligations-Screenings kleine Bibliotheken reaktiver Fragmente ausreichend, um den chemischen Raum aller möglichen Fragmentkombinationen zu durchmustern.

Eine generelle Voraussetzung der Fragmentligationsassays ist, dass ein reaktives Startfragment vorhanden sein muss. Diese Forderung kann problematisch sein, falls es keinen geeigneten, bereits bekannten Liganden des Zielproteins gibt. In solchen Fällen sind komplementäre Methoden, wie klassisches Screening oder Struktur-basiertes Design, unerlässlich, um einen Ausgangspunkt für die Fragmentligation zu finden.



Eine weitere Voraussetzung für Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationsassays ist, dass eine Ligationsreaktion verfügbar sein muss, die den relevanten chemischen Raum abdeckt und zugleich kompatibel mit den verwendeten Assaybedingungen ist. Wie in den Abschnitten 4 und 5 gezeigt wurde, steigt die Zahl der Reaktionen, die zur Anwendung im Rahmen eines Fragmentligationsassays angepasst werden konnten, stetig an, jedoch ist hier weitere Forschung nötig, um weitere der privilegierten Wirkstoff-artigen Fragmentverknüpfungen durch Ligationsassays zugänglich zu machen. Insbesondere Reaktionen zur Bildung von C-C-Bindungen, Heterocyclen und direkten Verknüpfungen zwischen cyclischen Fragmenten, die häufig über Kreuzkupplungen entstehen, sollten verstärkt untersucht werden.

Die kritische Evaluierung zeigt, dass Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen bereits heute als eine vielseitig einsetzbare Methode betrachtet werden können, die zum modernen Wirkstofffindungsprozess beitragen und die anderen etablierten und erfolgreichen Methoden ergänzen sollte. Dies ist besonders der Fall, wenn die spezifischen Vorzüge der Methode gefragt sind: räumlich aufgelöstes und gerichtetes Screening sowie hohe Empfindlichkeit für die Identifizierung neuer Fragmente und die chemische Weiterentwicklung von bekannten Proteinliganden.

Die zukünftige Forschung wird zeigen, ob es die spezifischen Vorteile der Methode ermöglichen werden, klinische Kandidaten mit verbesserten Eigenschaften hervorzubringen. Letzten Endes wird die Bedeutung der Proteintemplat-gesteuerten Fragmentligationen davon abhängen, in welchem Maße die Methode dazu in der Lage ist, zur großen Verheißung der Fragment-basierten Wirkstofffindung beizutragen: bessere Wirkstoffe mit hoher Potenz, Spezifität sowie weniger Zielprotein-unabhängigen Nebenwirkungen zu finden. Wahrscheinlich werden Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen in enger Zusammenarbeit mit anderen Fragment-basierten Methoden sowie der klassischen Leitstruktursuche ihren Beitrag zum Erreichen dieses Ziels leisten können. Über den praktischen Erfolg der Methode im Prozess der Wirkstofffindung hinaus liefern Proteintemplat-gesteuerte Fragmentligationen jedoch auch leistungsfähige und überaus attraktive Forschungs- und Lehrbeispiele, die uns beibringen, wie Teilstrukturen eines Moleküls additiv wechselwirken, um so hochaffine Proteinliganden bilden zu können. Damit hilft uns die Methode zu verstehen, wie molekulare Erkennung die Moleküle des Lebens funktionieren lässt und wie molekulare Evolution ablaufen kann.

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7358–7378  
*Angew. Chem.* **2017**, *129*, 7464–7485

[1] M. Jaegle, E. Nawrotzky, E. L. Wong, C. Arkona, J. Rademann in *Fragment-based Drug Discovery Lessons and Outlook*

(Hrsg.: D. A. Erlanson, W. Jahnke), Wiley-VCH, Weinheim, **2016**, S. 293–326.

- [2] J. Rademann, G. Jung, *Science* **2000**, *287*, 1947–1948.  
 [3] O. Ramström, T. Bunyapaiboonsri, S. Lohmann, J.-M. Lehn, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2002**, *1572*, 178–186.  
 [4] V. Das Gupta, A. Gupta, *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69*, 1145–1148.  
 [5] P. Storici, D. De Biase, F. Bossa, S. Bruno, A. Mozzarelli, C. Penef, R. B. Silverman, T. Schirmer, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 363–373.  
 [6] R. Borštnar, M. Repič, M. Kržan, J. Mavri, R. Vianello, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6419–6433.  
 [7] P. T. Corbett, J. Leclair, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711.  
 [8] J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 151–160.  
 [9] S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 219–226.  
 [10] M. F. Schmidt, J. Rademann, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 512–521.  
 [11] Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6634–6654.  
 [12] M. Mondal, A. K. H. Hirsch, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2455–2488.  
 [13] A. Herrmann, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1899–1933.  
 [14] S. Ulrich, P. Dumy, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5810–5825.  
 [15] D. Bosc, J. Jakhlal, B. Deprez, R. Deprez-Poulain, *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 381–404.  
 [16] G. G. Ferenczy, G. M. Keserü, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1039–1045.  
 [17] G. G. Ferenczy, G. M. Keserü, *MedChemComm* **2016**, *7*, 332–337.  
 [18] C. W. Murray, M. L. Verdonk, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 741–753.  
 [19] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4046–4050.  
 [20] V. Borsi, V. Calderone, M. Fragai, C. Luchinat, N. Sarti, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4285–4289.  
 [21] I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2106–2110.  
 [22] K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, C. Smet-hurst, H. Labischinski, R. Endermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3823–3828; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3981–3986.  
 [23] O. Ramström, J.-M. Lehn, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 41–48.  
 [24] R. Nguyen, I. Huc, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1774–1776; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1824–1826.  
 [25] K. B. Sharpless, R. Manetsch, *Expert Opin. Drug Discovery* **2006**, *1*, 525–538.  
 [26] X. Hu, R. Manetsch, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1316–1324.  
 [27] A. J. Clipson, V. T. Bhat, I. McNae, A. M. Caniard, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10562–10570.  
 [28] R. Huang, I. Leung, *Molecules* **2016**, *21*, 910.  
 [29] M. Hochgürtel, H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, A. V. Eliseev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3382–3387.  
 [30] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053–1057; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1095–1099.  
 [31] Y. Kubota, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, M. Fujita, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4854–4856.  
 [32] W. Jahnke, A. Flörsheimer, M. J. J. Blommers, C. G. Paris, J. Heim, C. M. Nalin, L. B. Perez, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 69–80.  
 [33] R. Larsson, Z. Pei, O. Ramström, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3716–3718; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3802–3804.  
 [34] C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641–3676.  
 [35] M. Angelin, R. Larsson, P. Vongvilai, O. Ramström, *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 1248–1251.

- [36] M. Mondal, N. Radeva, H. Köster, A. Park, C. Potamitis, M. Zervou, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3259–3263; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3324–3328.
- [37] Y. Bourne, K. B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1611–1621.
- [38] T. Hirose, N. Maita, H. Gouda, J. Koseki, T. Yamamoto, A. Sugawara, H. Nakano, S. Hirono, K. Shiomi, T. Watanabe, H. Taniguchi, K. B. Sharpless, S. Omura, T. Sunazuka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 15892–15897.
- [39] M. Gelin, G. Poncet-Montange, L. Assairi, L. Morellato, V. Huteau, L. Dugué, O. Dussurget, S. Pochet, G. Labesse, *Structure* **2012**, *20*, 1107–1117.
- [40] J. Yamane, N. Ohyabu, M. Yao, H. Takemoto, I. Tanaka, *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 1329–1337.
- [41] M. S. Congreve, D. J. Davis, L. Devine, C. Granata, P. G. Wyatt, H. Jhoti, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4479–4482; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4617–4620.
- [42] R. E. Babine, M. J. Rynkiewicz, L. Jin, S. S. Abdel-Meguid, *Lett. Drug Des. Discovery* **2004**, *1*, 173–177.
- [43] M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275–3278; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3319–3323.
- [44] M. I. Fernández-Bachiller, A. Horatscheck, M. Lisurek, J. Rademann, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1041–1056.
- [45] M. F. Schmidt, M. R. Groves, J. Rademann, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2640–2646.
- [46] E. Burda, J. Rademann, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5170.
- [47] M. F. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6346–6349; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6464–6467.
- [48] M. Jaegle, T. Steinmetzer, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3718–3722; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 3772–3776.
- [49] E. Oueis, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12158–12169.
- [50] A. J. R. Heck, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927–933.
- [51] S.-A. Poulsen, *Aust. J. Chem.* **2013**, *66*, 1495–1501.
- [52] E. B. Erba, C. Petosa, *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1176–1192.
- [53] L. Pedro, R. J. Quinn, *Molecules* **2016**, *21*, 984.
- [54] J. Klages, M. Coles, H. Kessler, *Analyst* **2007**, *132*, 692–705.
- [55] R. Larsson, O. Ramström, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 285–291.
- [56] P. Vongvilai, M. Angelin, R. Larsson, O. Ramström, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 948–950; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 966–968.
- [57] S. M. Turega, C. Lorenz, J. W. Sadownik, D. Philp, *Chem. Commun.* **2008**, 4076–4078.
- [58] R. Caraballo, H. Dong, J. P. Ribeiro, J. Jiménez-Barbero, O. Ramström, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 589–593; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 599–603.
- [59] I. K. H. Leung, T. Brown Jr, C. J. Schofield, T. D. W. Claridge, *MedChemComm* **2011**, *2*, 390.
- [60] L. Fielding, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 39–53.
- [61] M. Pellicchia, I. Bertini, D. Cowburn, C. Dalvit, E. Giralt, W. Jahnke, T. L. James, S. W. Homans, H. Kessler, C. Luchinat, B. Meyer, H. Oschkinat, J. Peng, H. Schwalbe, G. Siegal, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 738–745.
- [62] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531.
- [63] Z. Chilingaryan, Z. Yin, A. J. Oakley, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 12857–12879.
- [64] M. Mondal, D. E. Groothuis, A. K. H. Hirsch, *MedChemComm* **2015**, *6*, 1267–1271.
- [65] R. Zhang, F. Monsma, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2010**, *13*, 389–402.
- [66] M. K. Grøftehaug, N. R. Hajizadeh, M. J. Swann, E. Pohl, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2015**, *71*, 36–44.
- [67] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, *J. Recept. Signal Transduction* **2004**, *24*, 1–52.
- [68] G. A. Holdgate, *Expert Opin. Drug Discovery* **2007**, *2*, 1103–1114.
- [69] J. B. Chaires, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 135–151.
- [70] N. C. Garbett, J. B. Chaires, *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7*, 299–314.
- [71] T. S. Olsson, M. A. Williams, W. R. Pitt, J. E. Ladbury, *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1002–1017.
- [72] C. Bergsdorf, J. Ottl, *Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, *5*, 1095–1107.
- [73] I. Navratilova, A. L. Hopkins, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 44–48.
- [74] T. Rogez-Florent, L. Duhamel, L. Goossens, P. Six, A. S. Drucbert, P. Depreux, P. M. Danzé, D. Landy, J. F. Goossens, C. Foulon, *J. Mol. Recognit.* **2014**, *27*, 46–56.
- [75] T. Maki, A. Kawamura, N. Kato, J. Ohkanda, *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 940–943.
- [76] K. Tanaka, S. Shiotsuki, T. Iwata, C. Kageyama, T. Tahara, S. Nozaki, E. R. O. Siwu, S. Tamura, S. Douke, N. Murakami, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 637–645.
- [77] P. Parvatkar, N. Kato, M. Uesugi, S.-i. Sato, J. Ohkanda, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15624–15627.
- [78] L. You, J. S. Berman, E. V. Anslyn, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 943–948.
- [79] R. Caraballo, M. Sakulsombat, O. Ramström, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1600–1606.
- [80] D. Berkovich-Berger, N. G. Lemcoff, *Chem. Commun.* **2008**, 1686–1688.
- [81] J. A. Berrocal, R. Cacciapaglia, S. Di Stefano, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8190–8194.
- [82] L. R. Sutton, W. A. Donaubauer, F. Hampel, A. Hirsch, *Chem. Commun.* **2004**, 1758–1759.
- [83] C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979–985.
- [84] A. Herrmann, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3195–3204.
- [85] D. Becker, Z. Kaczmarek, C. Arkona, R. Schulz, C. Tauber, G. Wolber, R. Hilgenfeld, M. Coll, J. Rademann, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12761.
- [86] A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602–15603.
- [87] D. Larsen, M. Pittelkow, S. Karmakar, E. T. Kool, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 274–277.
- [88] J. B. Blanco-Canosa, I. L. Medintz, D. Farrell, H. Mattoussi, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10027–10033.
- [89] D. E. Prasuhn, J. B. Blanco-Canosa, G. J. Vora, J. B. Delehanty, K. Susumu, B. C. Mei, P. E. Dawson, I. L. Medintz, *ACS Nano* **2010**, *4*, 267–278.
- [90] W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 825–858.
- [91] S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 34–41.
- [92] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133.
- [93] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7633–7636.
- [94] M. G. Simpson, M. Pittelkow, S. P. Watson, J. K. M. Sanders, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1181–1187.
- [95] M. E. Belowich, J. F. Stoddart, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2003–2024.
- [96] M. Sindelar, K. T. Wanner, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1678–1690.
- [97] M. Sindelar, T. A. Lutz, M. Petrera, K. T. Wanner, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1323–1340.
- [98] M. Mondal, N. Radeva, H. Fanlo-Virgós, S. Otto, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9422–9426; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 9569–9574.

- [99] V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490–497.
- [100] F. T. Kern, K. T. Wanner, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 396–410.
- [101] S. P. Black, J. K. M. Sanders, A. R. Stefankiewicz, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1861–1872.
- [102] J. Leclaire, L. Vial, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **2005**, 1959–1961.
- [103] B. Rasmussen, A. Sørensen, H. Gotfredsen, M. Pittelkow, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3716–3718.
- [104] Z. Rodriguez-Docampo, S. Otto, *Chem. Commun.* **2008**, 5301–5303.
- [105] N. Zhu, F. Zhang, G. Liu, *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 531–540.
- [106] B. Brisig, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1270–1273; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1308–1311.
- [107] J. Atcher, I. Alfonso, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 25605–25608.
- [108] M. Angelin, R. Larsson, P. Vongvilai, O. Ramström, *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 1248–1251.
- [109] S. Ghosh, L. A. Ingerman, A. G. Frye, S. J. Lee, M. R. Gagné, M. L. Waters, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1860–1863.
- [110] B. Shi, M. F. Greaney, *Chem. Commun.* **2005**, 886–888.
- [111] M. Angelin, A. Fischer, O. Ramström, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3593–3595.
- [112] W. Zhang, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11863–11870.
- [113] L. Hunter, G. C. Condie, M. M. Harding, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5064–5067.
- [114] P. Edwards, *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 497–498.
- [115] S.-A. Poulsen, L. F. Bornaghi, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3275–3284.
- [116] S. R. Beeren, J. K. M. Sanders in *Dynamic Combinatorial Chemistry* (Hrsg.: J. N. H. Reek, S. Otto), Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, S. 1–22.
- [117] E. Oueis, F. Nachon, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2043–2045.
- [118] D. T. S. Rijkers, R. Merckx, C.-B. Yim, A. J. Brouwer, R. M. J. Liskamp, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 1–5.
- [119] X. Hu, J. Sun, H.-G. Wang, R. Manetsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13820–13821.
- [120] S. S. Kulkarni, X. Hu, K. Doi, H.-G. Wang, R. Manetsch, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 724–732.
- [121] C. Peruzzotti, S. Borrelli, M. Ventura, R. Pantano, G. Fumagalli, M. S. Christodoulou, D. Monticelli, M. Luzzani, A. L. Fallacara, C. Tintori, M. Botta, D. Passarella, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 274–277.
- [122] T. Suzuki, Y. Ota, Y. Kasuya, M. Mutsuga, Y. Kawamura, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. G. Finn, N. Miyata, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6817–6820; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6969–6972.
- [123] A. Krasinski, Z. Radić, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686–6692.
- [124] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [125] M. Mondal, M. Y. Unver, A. Pal, M. Bakker, S. P. Berrier, A. K. H. Hirsch, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14826–14830.
- [126] O. Š. Miljanić, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 909–910.
- [127] L. You, S. R. Long, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11017–11023.
- [128] M. Angelin, R. Larsson, P. Vongvilai, M. Sakulsombat, O. Ramström in *Dynamic Combinatorial Chemistry in Drug Discovery, Bioorganic Chemistry, and Materials Science* (Hrsg.: B. L. Miller), Wiley, Hoboken, **2010**, S. 169–200.
- [129] M. Lisurek, B. Rupp, J. Wichard, M. Neuenschwander, J. P. von Kries, R. Frank, J. Rademann, R. Kühne, *Mol. Diversity* **2010**, *14*, 401–408.
- [130] M. Demetriades, I. K. H. Leung, R. Chowdhury, M. C. Chan, M. A. McDonough, K. K. Yeoh, Y.-M. Tian, T. D. W. Claridge, P. J. Ratcliffe, E. C. Y. Woon, C. J. Schofield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6672–6675; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6776–6779.
- [131] I. K. H. Leung, M. Demetriades, A. P. Hardy, C. Lejeune, T. J. Smart, A. Szöllössi, A. Kawamura, C. J. Schofield, T. D. W. Claridge, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 547–555.
- [132] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9367–9372.
- [133] D. A. Erlanson, J. W. Lam, C. Wiesmann, T. N. Luong, R. L. Simmons, W. L. DeLano, I. C. Choong, M. T. Burdett, W. M. Flanagan, D. Lee, E. M. Gordon, T. O'Brien, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 308–314.
- [134] M. T. Cancilla, M. M. He, N. Viswanathan, R. L. Simmons, M. Taylor, A. D. Fung, K. Cao, D. A. Erlanson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3978–3981.
- [135] D. A. Erlanson, J. W. Arndt, M. T. Cancilla, K. Cao, R. A. Elling, N. English, J. Friedman, S. K. Hansen, C. Hession, I. Joseph, G. Kumaravel, W.-C. Lee, K. E. Lind, R. S. McDowell, K. Miatkowski, C. Nguyen, T. B. Nguyen, S. Park, N. Pathan, D. M. Penny, M. J. Romanowski, D. Scott, L. Silvan, R. L. Simmons, B. T. Tangonan, W. Yang, L. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3078–3083.
- [136] K. Fan, P. Wei, Q. Feng, S. Chen, C. Huang, L. Ma, B. Lai, J. Pei, Y. Liu, J. Chen, L. Lai, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 1637–1642.
- [137] H. Yang, M. Yang, Y. Ding, Y. Liu, Z. Lou, Z. Zhou, L. Sun, L. Mo, S. Ye, H. Pang, G. F. Gao, K. Anand, M. Bartlam, R. Hilgenfeld, Z. Rao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13190–13195.
- [138] M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435–1439; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1463–1467.

Manuskript erhalten: 23. Oktober 2016

Veränderte Fassung erhalten: 10. Januar 2017

Akzeptierte Fassung online: 24. Januar 2017

Endgültige Fassung online: 31. Mai 2017